

NACHWEIS UND ANREICHERUNG
DES ALLATOTROPEN HORMONS
DER WANDERHEUSCHRECKE,
LOCUSTA MIGRATORIA

Brigitte Schlagintweit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0087

NACHWEIS UND ANREICHERUNG DES ALLATOTROPEN HORMONS DER
WANDERHEUSCHRECKE, LOCUSTA MIGRATORIA

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Brigitte Schlagintweit
aus
München
1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rembold
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin
- Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.1987

Für meine Eltern

Die Vollendung der Kunst ist das höchste Ziel der
Menschheit, das sie sich selbst setzt. Sie ist die
Krone der menschlichen Existenz.

Es ist die Aufgabe der Kunst, die Welt zu
erschaffen, die wir uns vorstellen. Sie ist die
Kraft, die uns aus dem Alltag erhebt und uns
zu etwas Höherem führt. Sie ist die Sprache
der Seele, die uns mitteilt, was wir fühlen
und denken. Sie ist die Brücke zwischen
der Wirklichkeit und der Vorstellung.

Für Rolf

Es ist eine Freude, dich zu kennen und
deine Kunst zu sehen. Sie ist so schön
und so menschlich. Sie zeigt uns, was wir
föhlen und denken. Sie ist die Sprache
der Seele, die uns mitteilt, was wir
fühlen und denken. Sie ist die Brücke
zwischen der Wirklichkeit und der Vorstellung.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Prof. Dr. H. Rembold angefertigt.

Frau Dr. G. M. Ulrich danke ich für die Einführung in die mikrochirurgischen Methoden, Herrn H. Tober für wertvolle Diskussionen. Für die Aufnahme der H-NMR-Spektren bin ich Frau G. Schild, für die Aminosäurenanalyse Herrn W. Mewes zu Dank verpflichtet. Ferner danke ich Herrn Dr. Lottspeich und seinem Mitarbeiter Herrn J. Kellermann, Genzentrum der Universität München, für ihre wertvolle Hilfe bei der Hochdruckflüssigchromatographie von Peptiden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Rembold, der die für die Durchführung der Arbeit notwendigen Mittel großzügig bereitgestellt hat. Durch seine wertvollen Anregungen, seine Kritik und stete Anteilnahme ist diese Arbeit wesentlich beeinflusst worden.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2. Experimenteller Teil	8
2.1 Geräte	8
2.2 Reagenzien, Lösungsmittel und Kulturmedium	9
2.3 Tiermaterial	11
2.4 Bestimmung des Hämolympfvolumens	12
2.5 Chromatographische Methoden	13
2.5.1 Dünnschichtchromatographie	13
2.5.2 Hochdruckflüssigchromatographie	13
2.5.3 Reinigung an LiChroprep RP8	15
2.5.4 Chromatographie über Dextrangele	15
2.6 Biologischer Test: In vitro-Test der Corpora allata	16
2.7 Aufarbeitung von JH-III aus biologischen Proben	18
2.7.1 Reinigung und Derivatisierung des JH-III für den Nachweis im Massenspektrometer	18
2.7.2 Reinigung des ^{14}C -JH-III aus dem Inkubationsmedium	19
2.7.3 Reinheitsüberprüfung und Ausbeutebestimmung	21
2.8 JH-III-Säure	22
2.8.1 Darstellung von JH-III-Säure	22
2.8.2 Bestimmung von JH-III-Säure aus <u>Locusta</u> - Corpora allata	23
2.9 Sammeln und Aufarbeitung von Insektenmaterial zur Isolierung des allatotropen Faktors	23
2.9.1 Extraktion von <u>Locusta</u> -CC und Vorreinigung der Rohextrakte	24
2.9.2 Weitere Reinigung des Allatotropins an LiChroprep RP8	25
2.9.3 Anreicherung der allatotropen Aktivität durch HPLC	25

	Seite
2.10 Charakterisierung des allatotropen Faktors	26
durch Verdauung mit Trypsin und Pronase	
2.11 Proteinbestimmung	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Corpus allatum in vitro-Test	29
3.1.1 Untersuchung verschiedener Kulturmedien und Zusätze	30
3.1.2 Auswahl der Testtiere	36
3.1.3 Optimierung der Inkubationsdauer	39
3.1.3.1 3 Stunden-Inkubation	39
3.1.3.2 6 Stunden-Inkubation	40
3.1.3.3 9 Stunden-Inkubation	40
3.1.3.4 24 Stunden-Inkubation	41
3.2 Reinigung und Derivatisierung von JH-III	43
3.2.1 Austesten verschiedener Reinigungsmethoden für ^{14}C -JH-III	43
3.2.2 Verluste bei der Reinigung von nativem JH-III zur Bestimmung im Massenspektrometer	46
3.2.3 Verhalten der JH-III-Säure während der JH-Reinigung	49
3.3 Modulation der JH-III-Biosynthese während des ersten Eireifungszyklus	50
3.3.1 Bestimmung des Hämolympfvolumens	50
3.3.2 JH-III-Titer in vivo und CA-Aktivität in vitro	52
3.3.3 Schwankungen der CA-Aktivitäten während eines Kalenderjahres	56
3.3.4 Untersuchung der JH-III-Poolgröße der Corpora allata	58
3.3.5 Bestimmung der JH-III-Säure	59
3.4 Hemmung der Corpora allata in vitro	60
3.4.1 Desaktivierung durch CC-Organ	60
3.4.2 Hemmung der JH-Biosynthese durch Sephadex- Fraktionen	62
3.5 Aktivierung der CA in vitro mit Allatotropin	65

	Seite
3.5.1 Aktivierung mit CC-Organen	65
3.5.2 Fraktionierung von CC-Extrakt durch Gel- chromatographie	66
3.5.3 Weitere Reinigung der Fraktion C-2 über LiChroprep RP8	72
3.5.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung	74
3.5.5 Anreicherung des Allatotropins durch HPLC	75
3.5.5.1 Chromatographie von vorgereinigtem CC-Extrakt	75
3.5.5.2 Fraktionierung von entfettetem CC-Extrakt ohne Vorreinigung über Sephdex	80
3.5.5.3 Fraktionierung von Gehirn- und CC-Material	81
3.5.5.4 Chromatographie von AKH	83
3.5.5.5 Rechromatographie der Fraktion H-1 mit flachem Gradienten	84
3.6 Charakterisierung des ATH	89
3.6.1 Verdauung mit Trypsin und Pronase	89
3.6.2 Abschätzung der Molekülgröße	90
3.6.3 Ausbeutebestimmung und Anreicherung während der Reinigung	91
4. Diskussion	92
4.1 Zusammenhang zwischen JH-Titer und CA-Aktivität	92
4.2 Steuerung der JH-Biosynthese	98
4.3 Allatotropin	103
4.4 Charakterisierung des Allatotropins	107
5. Zusammenfassung	111
6. Literatur	113
7. Lebenslauf	127

ABKÜRZUNGEN

AKH	Adipokinetisches Hormon
ATH	Allatotropes Hormon
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	3',5'-cyclisches Adenosin-monophosphat
CA	Corpus allatum, Corpora allata
CC	Corpus cardiacum, Corpora cardiaca
cpm	gemessene Zerfälle pro Minute
dpm	berechnete Zerfälle pro Minute
DMNFHSC	Dimethyl-(nonafluorohexyl)-silylchlorid
IP	Isoelektrischer Punkt
HGH	Hyperglykämisches Hormon
HL	Hämolymphe
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPTLC	Hochdruckdünnschichtchromatographie
JH	Juvenilhormon
JH-III-Et	JH-III-Säure-ethylester
LTO	Länge der terminalen Oocyten
M I & II	Myoaktive Hormone I und II
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MG	Molekulargewicht
MIS	Multiple Ion Selection
n	Anzahl der Messungen
NCA	Nervus Corpori allati (Nerv zwischen CC und CA)
NCC	Nervus Corpori cardiaci (Nerv zwischen Gehirn und CC)
NSC	Neurosekretorische Zellen
PI	Pars intercerebralis
RIA	Radioimmuntest
PTTH	Prothoracotropes Hormon
TFA	Trifluoressigsäure
TLC	Dünnschichtchromatographie

1. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Das Hormonsystem der Insekten ist - wie das der Säuger - hierarchisch aufgebaut. Die übergeordneten Zentren befinden sich zum größten Teil im Gehirn. Der Zentralbereich des Gehirns (Pars intercerebralis, PI) und das Zentralnervensystem (Ganglienkette) enthalten Nervenzellen, sog. neurosekretorische Zellen (NSC), die die Fähigkeit besitzen, Sekrete (Neurohormone) zu bilden, die in den Nervenbahnen (Axonen) transportiert werden. In dem Neurohämalorgan der Corpora cardiaca (CC) wird das in den NSC gebildete Neurosekret gespeichert und möglicherweise in die biologisch aktive Struktur umgewandelt. Auch die Ganglien des Zentralnervensystems enthalten neben neurosekretorischen Zellen Neurohämalorgane, die die Hormone in das Blut (Hämolymphe) abgeben. Durch Kontrastfärbung, Kobaltfärbung oder fluoreszierende Farbstoffe (die auch an Antikörper gebunden sein können) lassen sich die neurosekretorischen Zellen und die neurosekretorischen Granula gut sichtbar machen.

Von den heute bekannten Neurohormonen sind die meisten entweder durch Entfernung des Neurohämalorgans oder durch Hitzeoagulation der NSC nachgewiesen worden. Die meisten Neurohormone sind deshalb nur durch ihre physiologischen Wirkungen bekannt, die in Biotests sowohl in vivo als auch in vitro untersucht wurden. Bis heute wurden folgende Neurohormone aus verschiedenen Insektenarten isoliert: Adipokinetisches Hormon (AKH)^{1,2}, Neurohormon D³, Herzschlagbeschleunigendes Hormon⁴, Prothoracotropes Hormon (PTTH)^{5,6}, Melanisierungshormon⁷ und Eclosionshormon^{8,9}. Weiterhin wurde die Wirkung auf die Diurese^{10,11,12,13} beschrieben, wobei die Isolierung des Diuretischen Hormons aus den CC von Locusta migratoria wohl kurz vor dem Abschluß stehen dürfte¹³. Faktoren oder Hormone, die den Trehalosegehalt der Hämolymphe beeinflussen, sind durch die Brutto-

zusammensetzung ihrer Aminosäuren charakterisiert worden¹⁴. In verschiedenen Insekten wurde ein Hyper-^{4,15,16,17} und ein Hypoglykämischer¹⁵ Faktor gefunden. Außerdem wurde aus der Bauchganglienkeette adulter Manduca sexta ein weiteres Peptid isoliert^{18,19}, das wie Neurohormon D und Herzschlagbeschleunigendes Hormon aus Periplaneta americana den Herzschlag stimuliert. Dabei dürften die beiden zuletzt genannten Peptide wahrscheinlich identisch sein. Ferner wurde die Wirkung von Neurosekret auf die Diapause²⁰ und auf die Eientwicklung^{21,22} beschrieben. Bei den physiologisch wirksamen Substanzen des Neurosekrets handelt es sich - soweit bekannt - um Peptidstrukturen. Von den bisher genannten Peptiden wurde nur das AKH, ein N-terminal blockiertes Dekapeptid, sequenziert und seine Struktur durch Synthese bestätigt^{1,23}.

Auch das Proctolin wurde als Pentapeptid in seiner Struktur aufgeklärt²⁴. Es wirkt auf die Muskulatur des Darms^{25,26}, des Herzens²⁷, des Ovidukts²⁸ und auf die Beinmuskulatur^{29,30}. Wegen der Verteilung des Proctolins im Zentralnervensystem und seiner Fähigkeit, verschiedene Muskeln zu beeinflussen, wird ihm eine Funktion als Neurotransmitter zugeschrieben^{24,31}. Weitere Neuropeptide, die nicht mit Proctolin identisch sind, aber ebenfalls eine Wirkung auf verschiedene Muskeln besitzen, wurden noch in mindestens zwei anderen Arbeitsgruppen isoliert^{32,33}. Eine Rolle als Neurotransmitter und als Neuromodulator spielt auch Octopamin, ein biogenes Amin. Zusätzlich kontrolliert es als Bestandteil der Hämolymphe die Freisetzung von Trehalose und Lipid aus dem Fettkörper³⁴. In Abbildung 1 ist das endokrine System der Insekten kurz schematisch zusammengefaßt.

Die meisten der genannten Neurohormone steuern Stoffwechselvorgänge im Insekt, während für Wachstum und Fortpflanzung hauptsächlich zwei Klassen von peripheren Hormonen verantwortlich sind: die Häutungshormone (Ecdyson

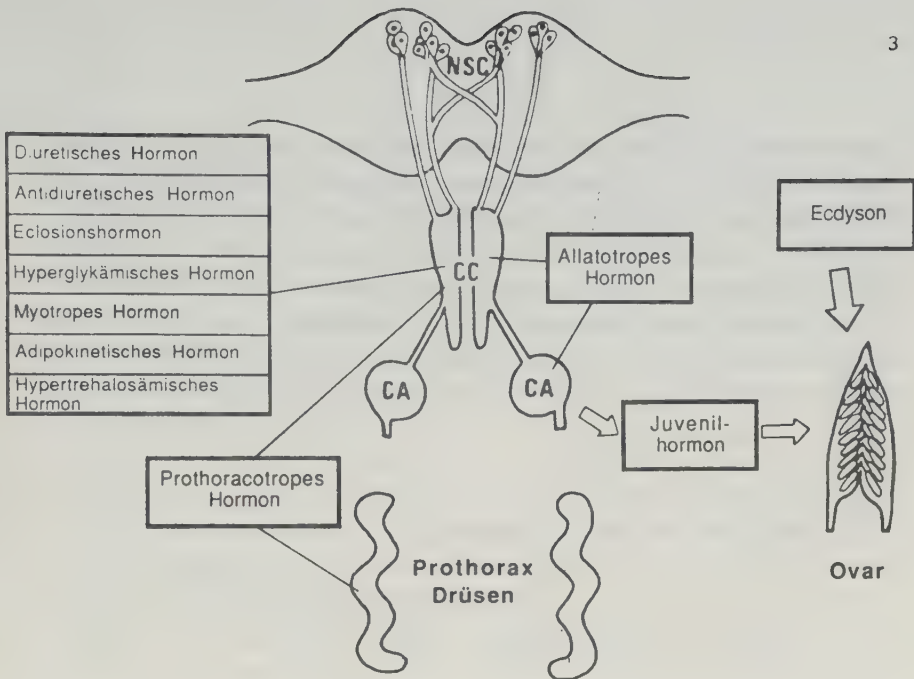


Abb. 1 Schematische Darstellung des endokrinen Systems der Insekten und der hormonellen Kontrolle der Eireifung

und 20-Hydroxyecdysen) und die Juvenilhormone (JH-0 bis JH-III). Ihre Biosynthese in der Prothoraxdrüse bzw. in den Corpora allata (CA) wird ebenfalls von Neurohormonen kontrolliert, die in den NSC des Gehirns gebildet werden. Die Entwicklung eines Insekts bis zum erwachsenen Tier wird durch das Zusammenspiel von JH und 20-Hydroxyecdysen, der biologisch aktiven Form des Ecdysons, gesteuert^{35,36,37,38}. Häutungsprozesse werden durch Ecdysen induziert, während JH die Art der Häutung bestimmt. Ein gleichzeitiges Maximum von Ecdysen und JH bewirkt eine Larven - Larvenhäutung, während ein Abfall des JH-Titers zu diesem Zeitpunkt bei einem holometabolen Insekt eine Larven - Puppenhäutung zur Folge hat. Das Fehlen von JH resultiert in einer Häutung zum adulten Tier, die nur von 20-Hydroxyecdysen kontrolliert wird. JH regelt in den meisten Insektenarten die Eientwicklung bei den Weibchen, außer in bestimmten Dipteren, wo sie von 20-Hydroxyecdysen gesteuert wird¹⁵⁵. Im

erwachsenen Weibchen regt JH den Fettkörper zur Synthese von Dotterprotein (Vitellogenin) an, das unter JH-Einfluß im Ovar in die wachsenden Eizellen als Vitellin eingebaut wird^{156,157}. Gegen Ende der Eireifung wird Ecdyson im Ovar (die Prothoraxdrüsen sind im erwachsenen Tier inaktiv) synthetisiert und ebenfalls in die Oocyten eingebaut; ihr Wachstum wird dann durch Bildung der Eischale (Choriogenese) abgeschlossen³⁹.

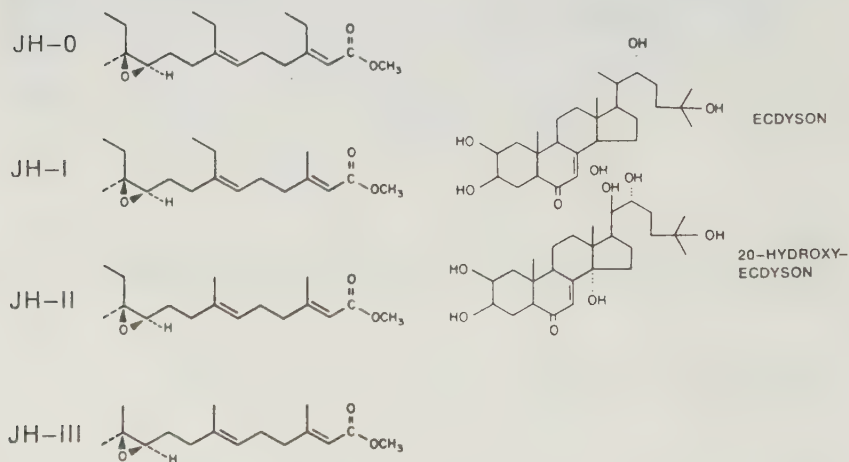


Abb. 2 Struktur der vier Juvenilhormone (JH-0 bis JH-III), von Ecdyson und von 20-Hydroxyecdysone

Ecdyson ist ein Steroidhormon⁴⁰ (Abb. 2), die Juvenilhormone sind Sesquiterpenoide, die sich vom 10,11-Epoxifarnesensäuremethylester ableiten⁴¹ (Abb. 2). Ecdyson und 20-Hydroxyecdysone werden üblicherweise nach Extraktion aus biologischem Material durch Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) getrennt und einzeln mit Hilfe eines Radioimmuntests (RIA) bestimmt⁴². Für die JH-Bestimmung wurde ebenfalls ein RIA entwickelt, in dem aus biologischem

Material extrahiertes JH als Diolderivat quantifiziert wird⁴³. Wegen der geringen Immunogenität der Lipide¹⁵⁸ sind die JH-Antikörper entsprechend unspezifisch. Deshalb sind die mit der RIA-Technik gewonnenen Daten weniger aussagekräftig als die mit GC-MS- bzw. GC-MIS-Messung⁴⁴ erzielten. Die gleichzeitige Bestimmung von Ecdyson und JH-Titer in einem einzelnen Locusta migratoria-Weibchen während des ersten Eireifungszyklus wurde bis heute nur von Rembold⁴⁵ beschrieben.

Wie schon erwähnt, stehen die peripheren Hormondrüsen, wie CA und Prothoraxdrüsen, ebenfalls unter NSC-Kontrolle. Die dominierende Rolle des Insektengehirns wurde schon sehr früh durch die klassischen Arbeiten von Kopec⁴⁶ (1917), Wigglesworth⁴⁷ (1940) und Williams⁴⁸ (1947) aufgezeigt. Das Prothoracotrope Hormon (PTTH), das die Ecdysonbiosynthese in der larvalen Prothoraxdrüse regelt, wurde aus Manduca sexta⁶ und Bombyx mori⁵ isoliert und als Peptid charakterisiert. Aus Bombyx mori wurden drei verschiedene PTTH's gewonnen⁵, die ein geringeres Molekulargewicht (MG) besitzen als das aus Manduca sexta, das außerdem noch durch seinen isoelektrischen Punkt (IP) charakterisiert wurde⁶.

Die JH-Biosynthese in den CA wird durch nervöse Verbindungen zwischen Gehirn und CC (NCC) bzw. CC und CA (NCA), stimulierende (Allatotropine) und/oder hemmende (Allatostatine, Allatohibine) Faktoren gesteuert (Übersicht von Tobe und Stay⁴⁹). Ihr indirekter Einfluß auf die Ovarentwicklung der Weibchen wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht^{50,51,52}. Eine Durchtrennung der NCA in Locusta migratoria bewirkt eine Abnahme der JH-Biosynthese^{53,54}; die Eientwicklung wird aber dadurch nicht beeinflusst⁵³. Die nervösen Verbindungen zwischen Gehirn und CC (NCC I und II) bzw. CA (NCA) scheinen bei Locusta migratoria und Schistocerca gregaria⁵⁵ einen stimulierenden Einfluß auf die JH-Biosynthese zu haben, während sie bei Leucophea maderae⁵⁶, Diploptera punctata^{57,58} und

Periplaneta americana⁵⁹ deutlich hemmend wirken. Bei all diesen Insektenarten handelt es sich um hemimetabole Insekten. Die Durchtrennung der NCC direkt am Gehirn von Locusta migratoria hat nach gelungener Operation, wenn die Gehirnhaut über die Wunde gewachsen ist, eine vollständige Sterilität der weiblichen Versuchstiere zur Folge⁶⁰. Der gleiche Effekt wird durch den drastischen Eingriff der Elektrokoagulation der NSC erreicht^{50,61,63}. Wenn nach der Abtrennung der NCC die Nervenstümpfe auswachsen, folgt eine normale, aber verzögerte Eientwicklung⁶⁰. Das Ausschalten des Allatotropins wird durch Injektion von CC-Extrakt geschlechtsreifer Weibchen und - unter Umgehen der JH-Biosynthese - durch JH-Injektion rückgängig gemacht⁶⁰. Eine elegante Methode, die hormonelle Kontrolle der JH-Biosynthese und letztlich der Eireifung zu untersuchen, ist das Abfangen der allatotropen Aktivität durch anti-Hormon Antikörper in vivo. Diese Technik wurde von Rembold et al.⁶³ an adulten Locusta migratoria-Weibchen angewandt; anti-Gehirn Antikörper (IGg) aus immunisierten Kaninchen hemmten die Vitellogeninsynthese dosisabhängig⁶⁰. Durch diese mikrooperativen und immunologischen Methoden gelang es, die Existenz eines allatotropen Faktors oder Hormons (ATH) zu beweisen. Es stammt aus der PI und wird über den NCC I zu den CC transportiert. Dort wird ATH in die Hämolymphe ausgeschieden.

Nachdem die Adulthäutung in Abwesenheit von JH stattfindet und im letzten Larvenstadium in Küchenschaben⁶⁴ und Wanderheuschrecken⁶⁵ die JH-Titer bestenfalls an der Nachweisgrenze liegen, kann ein Allatotropin in diesem Larvenstadium keine Rolle spielen. Zu Beginn des vorletzten Larvenstadiums vom Manduca sexta ist ein Allatotropin anwesend, nicht aber im letzten⁶⁶. In Locusta migratoria (erwachsene Tiere und Larven) wird eine stimulierende und eine hemmende^{61,67} Wirkung des Gehirns auf die CA beschrieben. Auch in adulten Diptoptera punctata stimuliert⁶⁸ und inhibiert⁵⁷ das Gehirn die JH-Biosynthese.

Weiterhin zeigten Untersuchungen von Rankin und Stay⁶⁹, daß neben Allatotropin und Allatostatin auch das Ovar eine Wirkung auf die JH-Biosynthese in Diploptera punctata besitzt.

Die Charakterisierung eines Allatotropins bzw. des Allatotropen Hormons (ATH) von Locusta migratoria ist das Ziel der vorliegenden Untersuchung. Dazu ist ein reproduzierbarer und verlässlicher Biotest Voraussetzung. Der von Pratt und Tobe^{70,71} eingeführte in vitro-Test für die JH-Synthese in explantierten CA wurde für diese Arbeiten verändert⁷². Er beruht auf dem Einbau von ¹⁴C-Methionin in JH-III, das durch Messung der Radioaktivität erfaßt wird. Insbesondere wurde die Reinigung des gebildeten JH-III aus dem Inkubationsmedium durch eine andere Methode ersetzt⁷². Die Menge von gebildetem JH wird als Maß für die Aktivität der CA gewertet. Um die physiologischen Verhältnisse während des ersten gonadotropen Zyklus kennenzulernen, war es notwendig, die Modulation der CA-Aktivität und den JH-Titer in der Hämolymphe zu untersuchen⁷³. Dafür wurde im Wesentlichen die Methode von Rembold und Lackner⁴⁴ angewandt, die es erlaubt, Juvenilhormon im Picomolbereich zu quantifizieren. Nachdem ein eindeutiger Nachweis für Allatotropin bzw. das Allatotrope Hormon sowohl in vivo^{60,63} als auch in vitro⁷² gelungen war, konnte es mit Hilfe von Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) um den Faktor 10⁸, bezogen auf das Tiergewicht, angereichert werden. Außerdem war es möglich, das ATH in seiner Aminosäurezusammensetzung näher zu charakterisieren.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Geräte

Für die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) wurde ein Pye Unicam-Gerät (LC-XPD-Pumpe, Philips, Kassel) verwendet. Die UV-Detektion erfolgte mit einem LC-UV-Detektor (Pye Unicam, Philips, Kassel, 10 µl Durchflußküvette). Mit einem programmierbaren Gradientenformer (Modell 250B, Gynkotec, München) wurde ein Lösungsmittelgradient hergestellt. Die Proben wurden mit einer Hamiltonspritze (Serie 8000) in die 150 µl-Probenschleife eines HPLC-Injektionssystems (Rheodyne, Santa Rosa) gegeben. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mit einem Integrator SP 4100 (Spectra Physics, Darmstadt).

GC-SIM-Messungen wurden mit einem IGC 120 DFL-Gaschromatographen (Intersmat, Courtry) durchgeführt, der mit einem CH7A-DF Massenspektrometer und einem SS100 Rechnersystem (Finnigan-MAT, Bremen) verbunden war. Die JH-Derivate wurden mit einem "Falling needle"-Injektionssystem (LKB-Clinicon, Bromma) auf eine "fused-silica"-Kapillarsäule, stationäre Phase DB1 (Filmdicke 0,25 µm, 30 x 0,32 mm i.D.; J. & W. Rancho, Cordova) aufgetragen. Die Injektortemperatur betrug 300 °C, die Chromatographie wurde bei 245 °C isotherm durchgeführt^{44,45}.

H-NMR-Spektren wurden mit einem Gerät WH 90 (Bruker, Karlsruhe) in Deuteriochloroform und mit TMS als internem Standard aufgenommen.

Zur Gelfiltration wurde eine Glassäule (30 cm x 1,5 cm i.D.) verwendet, die beidseitig mit den passenden Adaptern abgedichtet war. Lösungsmittel wurden mit einer Varioperpex-Pumpe 12000 (LKB, Bromma) auf die Säule mit 4 - 10 ml/h (s. Kap. 2.5.4) gebracht. Der Probennachweis erfolgte bei 280 nm

mit einem kontinuierlich arbeitenden UV-Detektor (Uvicord II, LKB, Bromma). Die Fraktionen wurden einzeln automatisch in einem LKB-Ultro-Rac-Fraktionssammler aufgefangen.

Die Radioaktivität der markierten Verbindungen wurde in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler Betamatic (Kontron, Münchenstein) gemessen. Die Position radioaktiver Verbindungen auf Dünnschichtplatten wurde mit Hilfe eines Dünnschichtscanners LB 2721-2503 (Bertold, München) und mit Methan als Zählgas bestimmt.

Die Präparation der Corpora allata (CA) und der Corpora cardiaca (CC) erfolgte unter einem Binokular (Leitz, Wetzlar).

Alle Arbeiten unter Reinraumbedingungen wurden in einer sterilen Bank unter laminarer Strömung (LaFlow, Radolfzell) durchgeführt. Zur Keimtötung wurde der Arbeitsplatz über Nacht mit UV-Licht bestrahlt.

2.2 Reagenzien, Lösungsmittel und Kulturmedium

Sofern nicht ausdrücklich erwähnt, hatten die Lösungsmittel und Reagenzien (Merck, Darmstadt, oder Riedel de Haen, Seelze/Hannover) p. a. Qualität.

Für die HPLC wurde Acetonitril (LiChrosolv) und Ammoniumacetat der Fa. Merck (Darmstadt) verwendet. Für den Trifluoressigsäure (TFA)-Puffer wurde "TFA für die Sequenzanalyse" (Fluka, Neu-Ulm) bezogen und bis zum Ansetzen des Puffers bei -20°C gelagert. Alle wässrigen Lösungen (für HPLC, Kulturmedium und Reinigung des JH-III) wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Trockener Ether war mit ca. 7 ppm 2,6-Di-tertiärbutyl-4-methylphenol (BHT)

als Antioxidans stabilisiert. Das für die JH-Silylierung verwendete Pyridin wurde über ausgeheiztem Molekularsieb aufbewahrt.

Die Reinigung des JH-III bzw. seiner Derivate wurde mit Lösungsmitteln (außer Methanol) der Fa. Mallinckrodt (Promochem, Wesel), Nanograde Qualität, durchgeführt. Für die Methoxyderivatisierung wurde trockenes Methanol (Merck, Darmstadt) und TFA (Merck, Darmstadt) verwendet, für die Silylierung getrocknetes Pyridin. Dimethyl-(nonafluorohexyl)-silylchlorid (DMNFHSC) war in unserem Labor entsprechend der Methode von Morgan und Poole⁷⁴ synthetisiert worden. JH-III-Ethylester war ebenfalls in unserem Labor nach Mori et al.⁷⁵ durch Umesterung aus JH-III (Fluka, Neu-Ulm) hergestellt worden.

Verschiedene Kulturmedien wurden für die in vitro-Inkubation der Corpora allata (CA) getestet. MEM (Minimum Essential Medium Eagle)-Medium⁷⁶ mit Hank's Salzen wurde als konzentriertes Fertigmedium von der Fa. Serva (Heidelberg) und als Pulvermedium von der Fa. Boehringer (Mannheim) bezogen. Das Medium für Locusta-Organe wurde nach Landureau und Grellet⁷⁷ aus den Einzelbestandteilen selbst hergestellt (Landureau-Medium). Diese Kulturmedien, die sich in ihrer Zusammensetzung nur geringfügig unterscheiden, erwiesen sich für den Biotest als wenig geeignet (s. Kap. 3.1.1). Das konzentrierte Fertigmedium von Serva besitzt außerdem begrenzte Verwendbarkeit in Bezug auf Sterilität einer angebrochenen Lösung. Gute Ergebnisse wurden mit dem Medium 199⁷⁸ mit Hank's Salzen (Pulvermedium der Fa. Boehringer, Mannheim) erzielt. Es ist mit 61 Bestandteilen komplexer zusammengesetzt als die vorher genannten Medien, insbesondere enthält es Ribose, Cholesterin, Glutathion Nucleinsäuren und deren Vorstufen, Eisennitrat, ATP als Energielieferanten und TWEEN 80 als Lösungsvermittler und möglichen Lieferanten für Ölsäure⁷⁸. Medium 199 ist wahrscheinlich mit dem Medium TC 199 identisch, das von Tobe

und Pratt⁷¹ beschrieben wird. Alle Medien wurden mit 20,1 mM Hepes-Puffer (Flow, Meckenheim) und 1,2 % Ficoll (Serva, Heidelberg) angereichert. Der Hepes-Puffer ermöglicht eine Kultur ohne CO₂-Inkubator. Zusätze von 0,1 mmol cAMP (Boehringer, Mannheim) und 0,2 mmol Farnesol (Serva, Heidelberg) waren während der Entwicklung des Testes hilfreich. Farnesol war ein Isomerengemisch der 2E,6E-Konfiguration und der 2Z,6E-Konfiguration. Nach dem Mischen der einzelnen Zusätze und Überprüfen des pH-Wertes (pH 7.25) wurde das Kulturmedium durch ein bakteriendichtes Filter (Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) steril filtriert, in sterilen 5 ml-Röhrchen portioniert und bis zur weiteren Verwendung im Biotest bei -20 °C eingefroren. Kurz vor dem Test wurde ¹⁴C-markiertes Methionin (spez. Radioaktivität 60,4 und 56,7 mCi/mmol, Amersham-Buchler, Braunschweig) in Medium gelöst und auf eine Radioaktivität des Methionins von 37,7 bzw. 36,2 mCi/mmol verdünnt.

2.3 Tiermaterial

Die in den Versuchen verwendeten Wanderheuschrecken (Locusta migratoria migratorioides, R&F (Reiche und Farmaire)) stammten überwiegend aus der Zucht von Frau Decarli, München, vereinzelt von Frau Hildner, Aurach. Die Tiere wurden als Larven zwischen dem 3. und 5. Larvenstadium geliefert und anschließend bei konstanter Beleuchtung bei 33 ± 2 °C und ca. 40 % rel. Luftfeuchtigkeit gehalten. Gefüttert wurde mit Weizenkeimlingen und Kleie. Neun bzw. 15 Stunden nach der Adulthäutung wurden die frisch geschlüpften erwachsenen Weibchen und Männchen abgesammelt und bis zur weiteren Verwendung (biologischer Test, Bestimmung des JH-Titers, Gewinnung von CC-Material) unter den oben beschriebenen Bedingungen in der Wanderphase gehalten. Um die Geschlechtsreife zu beschleunigen, wurden zu den jungen Locusta-Weibchen immer ältere Männchen

gesetzt. Unter diesen Bedingungen dauerte der erste Eireifungszyklus 9 bis 11 Tage. Die Eipakete wurden in Plastikschaalen abgelegt, die mit feuchtem Aquariensand gefüllt waren.

2.4 Bestimmung des Hämolympfvolumens

Das Hämolympfvolumen von adulten Locusta-Weibchen während des ersten Eireifungszyklus wurde in Anlehnung an Loughton und Tobe⁷⁹ bestimmt. Vor der Injektion wurde jedes Tier gewogen und individuell mit einer Nummer auf einem Klebeband am Flügel gekennzeichnet. 20 μCi ^{14}C -Inulin (spez. Radioaktivität 3,2 mCi/mmol, Amersham International, Buckinghamshire) wurden in 2 ml Phosphatpuffer (250 mM, mit Zusatz von 150 mM NaCl, pH 8.0) gelöst. Es wurden 5 μl dieser Lösung mit einer Hamiltonspritze in mit CO_2 betäubte Weibchen durch die Intersegmentalhaut zwischen dem 3. und 4. Abdominalsegment injiziert. Nach 45 Minuten wurden zweimal 5 μl Hämolymphe mit einer 5 μl -Glaskapillare (Assistent, Sondheim) am Metathorax hinter dem Sprungbein entnommen. In der Regel pumpen die Tiere diese Hämolympfmenge selbst aus dem Körper. Das Hämolympf-Inulingemisch wurde direkt in jeweils 5 ml wasseraufnahmefähigen Szintillator Kontrogel (Kontron, Münchenstein) pipettiert und im Szintillationszähler gemessen. Für die Eichkurve wurden je 5 μl Inulinlösung mit verschiedenen Hämolympfvolumina gemischt und jeweils Anteile von 5 μl für die Messungen entnommen. Alle Bestimmungen erfolgten, wie oben beschrieben, durch Doppelbestimmung. Bei jedem Versuchstier wurde außerdem die Länge der terminalen Oocyten bestimmt.

2.5 Chromatographische Methoden

2.5.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (TLC) diente zur präparativen Reinigung des ^{14}C -JH-III aus dem Inkubationsmedium. Verwendet wurden Fertigplatten (Merck, Darmstadt, Kieselgel 60, F 254, Nr. 5735) und Ethylacetat/n-Hexan (1:1) als Laufmittel. Das entnommene Inkubationsmedium wurde langsam auf eine vorher gekennzeichnete und mit JH-III ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ JH-III, 0,2 mm Schichtdicke) imprägnierte Stelle aufgetragen und mit aufsteigender Entwicklung bei Kammersättigung getrennt. UV-absorbierende Substanz wird beim Bestrahlen mit Licht der Wellenlänge 254 nm durch Fehlen der Fluoreszenz als dunkler Fleck erkennbar.

Zur analytischen Reinheitsprüfung und Charakterisierung von radioaktivem JH-III aus dem Inkubationsmedium und tritiiertem JH-III-Säure wurden HPTLC-Platten (Merck, Darmstadt, 0,1 mm Schichtdicke, Kieselgel 60, F 254) und Ethylacetat/n-Hexan (1:1) als Fließmittel verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines DC-Scanners. Als Referenz diente tritiiertes JH-III. Wegen der Licht- und Sauerstoffempfindlichkeit von JH-III und JH-III-Säure wurde die Zeit vom Auftragen der Probe auf die Platte bis zur Entwicklung möglichst kurz gehalten.

2.5.2 Hochdruckflüssigchromatographie

Mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) wurde das vorgereinigte Material aus Locusta-Corpora cardiaca weiter aufgetrennt. Es wurde eine 25 cm-Shandon-Säule (Shandon, Runcorn) mit 5 mm i.D. verwendet, die mit einem Gynkotek-Packgerät (Gynkotek, München) für

HPLC-Trennsäulen im Labor gefüllt wurde*). Als Füllmaterialien dienten ODS (5 µm, Shandon, Runcorn) und Vydac TP RP (10 µm, Chrompack, Müllheim). Die Flußgeschwindigkeit des Lösungsmittels betrug 1 ml/min, detektiert wurde bei 206 nm. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten, beginnend mit Wasser/0,1 % TFA (Puffer A), bis 50 % Acetonitril/Wasser/0,1 % TFA (Puffer B) während 50 Minuten; anschließend wurde isokratisch mit dem letzten Laufmittel (Puffer B) während 15 Minuten eluiert.

Für die Rechromatographie wurde der Gradientenanstieg zwischen 20 bis 56 % des Puffers B auf 0,5 %/min verringert. Der Anstieg auf 100 % Puffer B erfolgte während 5 Minuten, darauf folgte eine isokratische Elution mit Puffer B, 15 Minuten lang. Die Rechromatographie wurde mit zwei verschiedenen Puffersystemen durchgeführt:

I Puffer A: Wasser mit 0,1 % TFA

Puffer B: 50 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA

II Puffer A: Wasser mit 0,02 M Ammoniumacetat

Puffer B: 50 % Acetonitril in Wasser mit 0,02 M
Ammoniumacetat

Der pH-Wert des 0,04 M Ammoniumacetat-Stammpuffers wurde mit Eisessig auf 5.2 eingestellt. Die Retentionszeiten und andere Säulenparameter wurden durch Verwendung eines Gemisches verschiedener Benzoate (Methyl- bis Pentylbenzoat in Methanol) und von synthetischem Locusta-AKH (Adipokinetisches Hormon, Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos) standardisiert.

*) Herrn J. Forster danke ich für seine wertvolle Hilfe bei der Installierung der HPLC-Anlage.

2.5.3 Reinigung an LiChroprep RP8

Die Reinigung an LiChroprep RP8-Material erfolgte in einer kleinen offenen Glassäule (1,0 cm i.D.), die mit einer G2-Fritte nach unten abgedichtet war. Zur Entfernung der Luftblasen wurde das Säulenmaterial aufgerührt und nach dem Absetzen mit einem passenden Filterpapier (Nr. 595, Schleicher & Schüll, Dassel) beschwert.

Für die Entfettung und Vorreinigung von nativem und radioaktiv markiertem JH-III wurden 0,5 g LiChroprep RP8 in Ethylacetat aufgerührt und mit 4 ml Methanol und dem gleichen Volumen 50 % Methanol in 2 % wässriger NaCl-Lösung äquilibriert. Das biologische Material wurde in 4 ml der gleichen Lösung aufgetragen (s. Kap. 2.7.2).

Zur Abtrennung der JH-III-Säure von Salzen (NaCl) wurde 0,5 g Säulenmaterial mit Ethylacetat, dann zweimal in 2 ml Methanol und schließlich viermal in je 2 ml 10 % Methanol (Wasser) äquilibriert. Der biologische Extrakt wurde in 10 ml Lösung (10 % Methanol in Wasser) auf die Säule gegeben (s. Kap. 2.8.2).

Zur weiteren Reinigung von entfettetem CC-Extrakt wurde 0,5 - 0,75 g RP-Material in Acetonitril aufgerührt und für Routineaufarbeitungen mit 4 ml 50 % Acetonitril (Wasser) und 6 ml Wasser eingestellt. Für erste Chromatographieversuche an RP-Material wurde schrittweise mit je 4 ml Acetonitril, 30 % Acetonitril/Wasser, 20 % Acetonitril/Wasser und Wasser äquilibriert (s. Kap. 2.9.2).

2.5.4 Chromatographie über Dextrangele

Säulen mit 30 cm effektiver Länge (1,5 cm i.D.) wurden mit Sephadex G10, LH20 und G15 (Pharmacia, Uppsala) gepackt und mit 80 % wässrigem Methanol (entgast) äquilibriert. Die

Ausschlußgrenze wurde mit Bromphenolblau (für Sephadex G10 und LH20) und mit Dextranblau (für Sephadex G15) bestimmt. Die fettfreien CC-Extrakte wurden in 1,5 ml (Sephadex G10 und Sephadex LH20) - 3,5 ml (Sephadex G15)-Portionen aufgetragen. Eluiert wurde über Nacht mit 80 % wässrigem Methanol mit einer Fließgeschwindigkeit von 4 ml/h (Sephadex G10), 6 ml/h (Sephadex LH20) und 10 ml/h (Sephadex G15) bei +4 °C. Die einzelnen Substanzen wurden bei 280 nm detektiert.

2.6 Biologischer Test: In vitro-Test der Corpora allata

Die Wirkung des Materials aus den Corpora cardiaca (CC) auf die Corpora allata wurde in einem Biotest überprüft. Adulte Locusta-Weibchen bestimmten Alters (1,5 Tage - 14 Tage nach der Adulthäutung) wurden vor der Operation gewogen, mit CO₂ betäubt und die Länge der terminalen Oocyten (LTO) mit Millimeterpapier unter dem Binokular gemessen.

Pro Inkubationsansatz wurden die CA von einem Tier (unter dem Binokular) trocken herauspräpariert, wobei ein Stück des Corpus allatum-Nervs (NCA I) an der Drüse zum Transferieren belassen wurde, und in sterilem Kulturmedium (ohne ¹⁴C-Methionin) von Hämolymphe und anhängendem Fettkörper befreit. Anschließend wurden beide CA in 100 µl sterilem Inkubationsmedium, das mit ¹⁴C-Methionin angereichert war, für eine bestimmte Zeit bei 31 ± 1 °C (im Wasserbad) im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert. Für die Inkubation wurde ein silikonisiertes (Silikonlösung Serva, Heidelberg) und sterilisiertes 1,2 ml-Glaskölbchen mit Schliffstopfen (NS 12,5) verwendet.

Nachdem sich eine Inkubationszeit von 3 Stunden als zu gering erwiesen hatte, wurden die CA-Aktivitäten während 9, 12 und 24 Stunden gemessen. Zunächst erwies sich eine

Inkubationsdauer von 9 Stunden als brauchbar. Dabei wurden nach 1, 3 und 6 Stunden je 50 μ l des Inkubationsmediums mit einer Hamiltonspritze entnommen. Der Inkubationsansatz der Kontroll-CA wurde mit "heißem" Medium 199 in einer dem entnommenen Isotop entsprechenden Menge wieder auf 100 μ l aufgefüllt. Für Aktivierungsversuche wurden trockene CC-Fraktionen in entsprechendem Volumen radioaktivem Medium gelöst und bei jeder Probenentnahme 50 μ l dem verbliebenen Inkubationsmedium zugesetzt. Nach 9 Stunden wurde die Inkubation durch Entnahme von 50 μ l Medium beendet. Später konnte die Testdauer auf 6 Stunden reduziert werden, wobei ein einmaliger Wechsel von 50 μ l Medium nach 2 Stunden erfolgte. Einzelne Fraktionen wurden an mindestens drei CA-Paaren getestet; als Kontrollen dienten mindestens ebensoviele CA aus Spendern des gleichen homogenen Tiermaterials.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die gemessenen JH-Mengen nach 2 Stunden (früher nach 1, 3 und 6 Stunden) berücksichtigt. Sie erfolgte nach der unten angegebenen Formel. Inaktive - wahrscheinlich bei der Operation verletzte - CA wurden vernachlässigt. Absolute JH-III-Werte von einem oder mehreren Tests wurden zusammengefaßt und die Standardabweichung vom Mittelwert berechnet⁸⁰.

Berechnung der ins Medium abgegebenen JH-III-Menge aus der spezifischen Radioaktivität des ¹⁴C-Methionins

$$\text{JH-III (pmol)} = \frac{\text{dpm} \times 0,45^*) \text{ (pCi)}}{\text{Ausbeute}^{**}) \times \text{spez. Radioaktivität (pCi/pmol)}}$$

*) 1 dpm = 0,45 pCi

**) Ausbeute = Ausbeute (%) der Aufarbeitung und Zählerausbeute

2.7 Aufarbeitung von JH-III aus biologischen Proben

Für die Bestimmung des JH-Titers in vivo wurden 10 - 50 µl Hämolymphe aus Locusta-Weibchen in 2 ml Methanol, in denen 5 oder 10 pmol JH-III-Ethyl-Standard gelöst waren, pipettiert. Die Probe wurde mehrmals kräftig geschüttelt, um das denaturierte Protein zu extrahieren. Aus dem gleichen Tier wurden die CA in der beschriebenen Weise in vitro inkubiert und ihre Aktivitäten nach 2 und 6 Stunden gemessen. 50 µl Kulturmedium ohne CA wurden bei jeder Probenentnahme in einem Reagenzglas mit 5 oder 10 pmol JH-III-Ethylester als Standard, 100 µl Methanol, das zum Spülen der Spritze verwendet worden war, und weiteren 1,9 ml Methanol gemischt.

Die Corpora allata von 4 oder 8 Locusta-Weibchen wurden sorgfältig aus der Kopfkapsel herauspräpariert und von Hämolymphe und anhängendem Gewebe befreit. In einem 3 ml Glaspottergefäß wurden alle 8 oder 16 Drüsen mit einem Glasstab in 0,5 ml Methanol und 5 pmol JH-III-Ethyl-Standard bei Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Reagenzglas überführt und dreimal mit 0,5 ml Methanol, das zum Spülen des Homogenisators diente, vereinigt.

Alle biologischen Proben mit Referenzsubstanz waren bis zur weiteren Reinigung des JH-III in methanolischer Lösung, zum Teil mehrere Wochen lang, bei - 20 °C eingefroren. Dabei konnten keine durch Lagerung bedingten Verluste festgestellt werden.

2.7.1 Reinigung und Derivatisierung des JH-III für den Nachweis im Massenspektrometer

Die Reinigung des JH-III erfolgte im wesentlichen nach der mikroanalytischen Methode von Rembold und Lackner⁴⁴. Da in biologischen Proben aus Hämolymphe, CA und Kulturmedium

nur sehr wenig Lipid zu erwarten war, konnte auf die Vorreinigung über LiChroprep RP8 verzichtet werden. Die methanolische JH-Lösung wurde mit 2 ml 2 % wässriger NaCl-Lösung verdünnt und dreimal mit 0,5 ml Pentan oder Isooctan extrahiert. In der Regel trennten sich die beiden Phasen gut voneinander, nur die Hämolympfproben mußten kurz zentrifugiert werden. Die in einem 2 ml-Derivatisierungs-gläschen gesammelte organische Phase wurde mit 250 µl 2 % NaCl-Lösung gewaschen. Der Extrakt wurde an einer mit 0,5 g Aluminiumoxid (Aktivitätsstufe III, Merck) gefüllten Säule (Pasteurpipette) filtriert, die nach unten mit Glaswolle abgedichtet war. Statt mit Isooctan wurde mit 1 ml Pentan äquilibriert, die aufgetragene Pentanphase mit zweimal 1 ml Methylenchlorid in Pentan (3:7) gewaschen. JH-III wurde mit Methylenchlorid eluiert.

Die darauffolgende Derivatisierung zu 10-Hydroxy-11-Methoxy-JH-III, die Silylierung und die Entfernung des überschüssigen Silylierungsreagenzes erfolgten nach dem Verfahren von Rembold und Lackner⁴⁴. Nach der Reinigung an Aluminiumoxid und der Elution des 10-Dimethyl(nonafluorohexyl)silyloxy-11-methoxy-JH-III wurde das Eluens im Heliumstrom entfernt. Der Rückstand wurde unter Schütteln in 50 µl Cyclopentan gelöst und ein Aliquot mit Hilfe der GC-MS-Methode gemessen. Wenn die Proben aus dem Inkubationsmedium stammten, wurde die Hälfte der Cyclopentanlösung mit Insta FluorTM-Szintillator (Packard, Warrenville) versetzt und im Szintillationszähler gemessen.

2.7.2 Reinigung des ¹⁴C-JH-III aus dem Inkubationsmedium

Das Kulturmedium wurde unmittelbar nach der Probenentnahme auf einer Dünnschichtplatte chromatographiert. Nach der Entwicklung der Platten wurde das Kieselgel aus dem mit JH-III markierten Bereich mit einem Spatel ausgekratzt und in einem Szintillationsröhrchen aus Plastik (Packard,

Warrenville) in Szintillator für organische Substanzen (Insta FluorTM Packard, Warrenville) suspendiert. Nach dem Abklingen der Chemolumineszenz und dem Absetzen des Kieselgels (ca. 30 - 45 Minuten) wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die Zählausbeute für ¹⁴C betrug $91 \pm 2 \%$.

Später erwies sich diese Reinigung des ¹⁴C-JH-III als fehleranfällig: das Kieselgelsediment führte zu erhöhten Quenchwerten bei der radioaktiven Messung; zusätzlich fehlte ein innerer Standard.

Deshalb wurde das ins Medium abgegebene JH-III von nicht umgesetztem ¹⁴C-Methionin und anderen radioaktiv markierten Stoffen in Anlehnung an die JH-Reinigung für die GC-MS-Messung gereinigt. 50 µl Inkubationsmedium, zweimal 50 µl Spülmethanol (aus der Hamiltonspritze) und 0,02 µCi oder 0,06 µCi tritiiertes JH-III (spez. Radioaktivität 11,0 Ci/mmol, NEN, Dreieichenhain) als innerer Standard wurden nach der Probenentnahme eingefroren. Die Probe wurde unter Schütteln in 1 %iger NaCl-Lösung/Methanol (1:10 auf 4 ml verdünnt) an LiChroprep RP8 adsorbiert und zweimal mit 2 ml der gleichen Lösung gewaschen. Dadurch wurde ein Großteil des ¹⁴C-Methionins entfernt. JH-III wurde mit zweimal 1 ml Methanol eluiert. Anschließend wurde die Methanollösung mit 2 ml 2 % NaCl-Lösung versetzt und mit dreimal 0,5 ml Pentan extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit 250 µl 2 % NaCl-Lösung gewaschen. Der Pentanextrakt wurde an Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe III (Merck, Darmstadt), das mit 10 % Ether in Pentan äquilibriert war, getrocknet. ¹⁴C- und ³H-JH-III wurden nach dem Waschen des Al₂O₃ mit zweimal 1 ml 10 % Ether/Pentan mit einer Ether/Pentan-Lösung (2:3) in ein Szintillatorröhrchen gespült. Das Lösungsmittel wurde im Heliumstrom entfernt, der Rückstand mit Insta FluorTM-Szintillator aufgenommen und die Radioaktivität gemessen. Für die Messung der doppeltmarkierten Proben war es notwendig, den Szintilla-

tionszähler durch Verschieben des Tritium-Kanals zu korrigieren. Dadurch sank die Meßausbeute für ^{14}C auf $70 \pm 1 \%$; die für Tritium betrug ca. 40 % (normalerweise ca. 50 %), was jeweils durch den externen Standard bestimmt wurde. Bei der Auswertung wurden die gemessenen Werte für ^{14}C -JH-III nach der Ausbeutebestimmung mit dem ^3H -JH-III-Standard korrigiert.

2.7.3 Reinheitsüberprüfung und Ausbeutebestimmung

Für die Reinigung des ^{14}C -JH-III, das während des CA-Testes in vitro synthetisiert wurde, reicht die Filtration über LiChroprep RP8, die Pentanextraktion und die Chromatographie an Aluminiumoxid aus. Dabei muß mit einem Verlust von ^{14}C -markiertem JH-III von 10 - 20 % gerechnet werden, was durch Zugabe von tritiiertem JH-III als Referenzsubstanz in jeder Inkubationsprobe überprüft werden kann.

Zusätzlich wurden die Fraktionen aller Reinigungsschritte mit schneller Dünnschichtchromatographie (HPTLC) auf Reinheit geprüft.

Für die Ausbeutebestimmung von JH-III durch GC-MS-MIS wurden sowohl Proben von Hämolymphe sehr junger Weibchen, die kein natives JH-III enthielten, als auch von "heißem" Medium 199 (ohne CA) tritiiertes JH-III zugesetzt. Durch radioaktive Messung von Äquivalenten der weiterzuverarbeitenden JH-III-Phasen und der jeweils anfallenden Waschfraktionen wurde die Ausbeute für die einzelnen Anreicherungsschritte bestimmt. Für wässrige bzw. salzhaltige Proben wurde Kontrogel-Szintillator (Kontron, Münchenstein) verwendet. Die Endausbeute wurde durch Messung von Radioaktivität und GC-MS-Signalen der gleichen Probe ermittelt. Die Gesamtausbeute bei etwa 7 oder 14 ng vorhandenem JH-III betrug rund 70 % (s. Kap. 3.2.2).

2.8 JH-III-Säure

2.8.1 Darstellung von JH-III-Säure

Tritiiertes JH-III wurde in einem konischen 2 ml-Reaktionsgefäß, das mit einer teflonbeschichteten Gummidichtung verschlossen war, mit 0,5 - 1,0 ml 1N NaOH in Methanol (1:1) 4 Stunden im Dunkeln bei 40 °C inkubiert. Während der Reaktionszeit wurde mit einem glasüberzogenen Rührmagneten gerührt. Eine Kinetik der Hydrolyse ist in Abbildung 3 dargestellt. Sie zeigt, daß nach 4 Stunden Inkubationszeit fast das gesamte JH-III zur Säure verseift wurde. Noch vorhandenes JH-III läßt sich mit dreimal 0,5 ml Isooctan oder Pentan aus dem alkalischen Reaktionsgemisch extrahieren. Nach dem vorsichtigen Ansäuern mit 1N HCl auf pH 5.0 kann auch die JH-III-Säure in die organische Phase (Pentan, Isooctan oder Chloroform) überführt werden. Wenn der pH-Wert unterschritten wird, addiert der Epoxidring Alkohol unter Bildung eines Halbethers. Es ist dann mit größeren Verlusten von JH-III-Säure zu rechnen. Die Ausbeute bei der Hydrolyse lag bei ca. 95 %. Für H-NMR-Messungen wurden 10 mg JH-III auf die gleiche Weise umgesetzt und sofort gemessen.

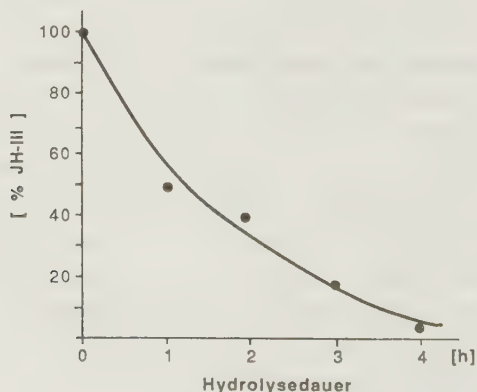


Abb. 3 Kinetik der JH-III-Hydrolyse während 4 Stunden

2.8.2 Bestimmung von JH-III-Säure aus Locusta-Corpora allata

Die methanolischen CA-Extrakte wurden mit dem gleichen Volumen (2 ml) 1 % NaCl verdünnt und das JH-III mit dreimal 500 µl Isooctan oder Pentan ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde für die JH-III-Messung durch GC-MS weiterverarbeitet (s. Kap. 2.7.1). Der wässrig-methanolischen Lösung wurde JH-III-Ethylester als Referenzsubstanz zugesetzt. Die Probe wurde im Heliumstrom auf 3 ml eingengt und mit 7 ml Wasser auf eine 10 %ige methanolische Lösung verdünnt. Durch Filtration über ein äquilibriertes LiChroprep RP8-Säulchen (0,5 g) und Waschen mit 2 ml des gleichen Lösungsmittels wurde das Salz entfernt (s. Kap. 2.5.3). Adsorbierte JH-III-Säure und Standard wurden mit 2 ml Methanol eluiert und mit Diazomethan versetzt, bis die Lösung ihre hellgelbe Farbe behielt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum vorsichtig eingengt und der Rückstand mit dreimal 0,5 ml Pentan wieder gelöst. So veresterte JH-III-Säure konnte nun durch normale JH-III-Aufarbeitung mit der GC-MS-Messung bestimmt werden.

Die Ausbeute, gemessen in Hämolymp-Ph-Proben durch Zusatz tritierter Säure, wurde nach jedem Reinigungsschritt und nach der Veresterung durch radioaktive Messung von Äquivalenten bestimmt. Sie betrug mindestens 90 %.

2.9 Sammeln und Aufarbeitung von Insektenmaterial zur Isolierung des allatotropen Faktors

Gehirne und/oder Corpora cardiaca (CC) von adulten männlichen und weiblichen Wanderheuschrecken dienten als Ausgangsmaterial. Alle Tiere waren 14 - 21 Tage alt und geschlechtsreif; die Weibchen befanden sich zu diesem Zeitpunkt mindestens im zweiten Eireifungszyklus. Ein zusätzliches Absetzen des Futters 15 Stunden vor der

Präparation führt zu einem Neurosekretstau in Gehirn und CC. Sofort nach der sorgfältigen Präparation aus der Kopfkapsel wurden die Gehirne und CC entweder getrennt oder zusammen in Aceton auf -77°C (Aceton/Trockeneis) gekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung in der Tiefkühltruhe (-20°C) aufbewahrt. Für die Gewinnung des ATH wurden vorwiegend die CC verwendet. Gehirnmaterial wurde nach der gleichen Methode gereinigt.

2.9.1 Extraktion von Locusta-CC und Vorreinigung der Rohextrakte

70 - 200 Organe wurden in einem 9 ml Braun-Homogenisator in 5 ml Aceton bei Eiskühlung mit einem Teflonstempel homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert, der Überstand abgehoben und gesondert bei 0°C aufbewahrt. Nach viermaliger (bei mehr als 170 Organen fünfmaliger) Wiederholung der Extraktion wurde der nun weitgehend fettfreie Rückstand unter Stickstoff getrocknet, in 5 ml 80 % wässrigem Methanol suspendiert, erneut extrahiert und zentrifugiert. Die Methanol-Extraktion wurde ebenfalls vier- bis fünfmal wiederholt und die Überstände vereinigt. Die vereinigten acetonhaltigen Extrakte wurden im Rotationsverdampfer eingeengt. Der lipidhaltige Extrakt wurde in n-Hexan gelöst, dreimal gegen Wasser ausgeschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit der methanolischen Lösung vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum vorsichtig entfernt. Die Temperatur des Wasserbades betrug 35°C . Der getrocknete, fettfreie Extrakt wurde mit Stickstoff überschichtet und bei -20°C aufbewahrt.

Dieser Entfettungsprozedur für das CC-Material folgte eine Gelchromatographie auf Sephadex G10, LH20 oder G15. Das Aliquot von 100 - 130 Organen konnte gleichzeitig auf der verwendeten Säule gereinigt werden. Dabei wurde der trockene Extrakt in 1,5 ml 80 % Methanol/Wasser aufgenommen. Sollte

sich dabei nicht alles Material gelöst haben, wurde nochmals zentrifugiert. Das Gläschen wurde mit 1,0 ml Methanollösung (80 %) ausgespült und diese zusammen mit dem gelösten CC-Material chromatographiert. Als Elutionsmittel diente 80 % Methanol/Wasser (s. Kap. 2.5.4). Die gesammelten 1,5 ml- bzw. 3,5 ml-Portionen wurden den einzelnen UV-Absorptionen zugeordnet, vereinigt und zur Trockene eingeeengt. Die Fraktionen wurden trocken bei -20°C aufbewahrt.

2.9.2 Weitere Reinigung des Allatotropins an LiChroprep RP8

Das nach der Entfettung bzw. nach der Sephadex-Gelfiltration verbliebene CC-Material wurde in 2 ml Wasser gelöst und auf äquilibriertem LiChroprep RP8 (s. Kap. 2.5.3) weiter angereichert. Eluiert wurde schrittweise mit je 10 ml Wasser, 20 % Acetonitril/Wasser, 30 % Acetonitril/Wasser und reinem Acetonitril.

Für die Reinigung von mehreren hundert CC wurde dieses Verfahren vereinfacht: Adsorbiertes biologisches Material wurde von LiChroprep RP8 mit je 10 ml Wasser, 50 % Acetonitril in Wasser und Acetonitril eluiert. Alle aufgefangenen Fraktionen wurden im Vakuum getrocknet und eingefroren.

2.9.3 Anreicherung der allatotropen Aktivität durch HPLC

Die weitere Fraktionierung des biologischen Materials erfolgte durch HPLC. Der über LiChroprep gereinigte Extrakt wurde in 50 % Acetonitril/Wasser gelöst. Dabei entstandene Trübungen wurden durch Mikrofiltration über ein Millipore HV-Filter (Porengröße $0,45\text{ }\mu\text{m}$, Millipore, Massachusetts) entfernt, das auf eine Hamiltonspritze aufgesteckt war. Der klare Extrakt wurde im Heliumstrom auf 60 - 80 μl eingeeengt und in ein Rheodyne-Injektionssystem eingespritzt. Das

Glasgefäß wurde einmal mit wenig Lösungsmittel (ca. 60 µl) gespült, die Lösung ebenfalls injiziert. Die erste Chromatographie des CC-Materials über HPLC fand grundsätzlich in Puffersystem I während 50 Minuten statt. Das gesamte Eluat wurde in 4 Fraktionen getrennt und nach seiner Retentionszeit manuell gesammelt.

Die Rechromatographie der Fraktion H-1 (s. Kap. 3.5.5.5) wurde zuerst mit Puffersystem I und anschließend mit Puffersystem II durchgeführt. Soweit möglich, wurde dabei das Eluat anhand einzelner Peaks aufgefangen. Alle Fraktionen wurden eingengt und zum Entfernen des Puffers über Nacht bei 0,02 mb lyophilisiert. Für den biologischen Test wurden Anteile der einzelnen Fraktionen in 50 % Acetonitril/Wasser ein zweites Mal lyophilisiert und die trockenen Rückstände bei -20 °C aufbewahrt. Die Anreicherung von größeren Mengen CC-Material erfolgte auf die gleiche Weise durch mehrfach wiederholte Chromatographie. Als externe Referenzsubstanz wurde synthetisches Locusta-AKH chromatographiert.

2.10 Charakterisierung des allatotropen Faktors durch Verdauung mit Trypsin und Pronase

Es wurden 12 - 20 CC-Äquivalente (vorgereinigt durch Sephadex G15) und 25 µg Trypsin (Serva, Heidelberg) in 100 µl 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7.0, Bergmeyer⁸¹) zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Verdauungsenzym durch Filtration über eine LiChroprep RP8-Säule entfernt. Nach dem Waschen mit Wasser wurde das an LiChroprep RP8 adsorbierte Hydrolysat mit 50 % Acetonitril/Wasser eluiert. Diese Fraktion wurde getrocknet und im CA-Test auf seine biologische Aktivität überprüft.

Die Enzymaktivität wurde mit Rinderserumalbumin (BSA, 96 % Reinheit, Serva, Heidelberg) und Ninhydrin nach Bergmeyer⁸¹ getestet. 100 µg BSA und 25 µg Trypsin wurden in Phosphatpuffer inkubiert und mit Ninhydrinreagenz versetzt. Weitere 25 µg Trypsin wurden über LiChrorep RP8 fraktioniert, die einzelnen Fraktionen mit BSA in Puffer inkubiert und mit Ninhydrin auf enzymatische Tätigkeit überprüft. Die Extinktionswerte bei 570 nm zeigten, daß Trypsin unter den angegebenen Reinigungsbedingungen denaturiert oder irreversibel an LiChrorep adsorbiert wurde (s. Tab. 1).

Tabelle 1 Extinktionswerte bei 570 nm von Ninhydrinreaktionen nach BSA-Hydrolyse mit nativem und chromatographiertem Trypsin

Testansatz	E ₅₇₀
Trypsin	0
BSA und Trypsin	0,370
BSA	0,149
BSA und fraktioniertes Trypsin	
Wasser-Fraktion	0,134
20 % Acetonitril/Wasser-Frakt.	0,134
30 % Acetonitril/Wasser-Frakt.	0,149
Acetonitril-Fraktion	0,130

Die Hydrolyse von biologisch aktivem Material mit Pronase wurde unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt. 1 µg Proteinase K (Merck, Darmstadt) und CC-Extrakt wurden in 100 µl 1 M Phosphatpuffer (pH 8.0, nach Bergmeyer⁸²) eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch Adsorption an LiChrorep RP8 wie beschrieben entfernt, eventuell nicht

hydrolysiertes, aktives CC-Material mit 50 % Acetonitril/Wasser eluiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mit BSA und Ninhydrin wurde die Pronaseaktivität und die Retention von Pronase auf LiChrorep überprüft.

2.11 Proteinbestimmung

Protein wurde mit dem BIO-RAD-Microassay (BIO-RAD, München, nach Bradford⁸³) mit kristallinem BSA als Standard bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Anreicherung von biologisch aktivem Material aus Locusta-CC verfolgt. Beginnend mit der Methanolextraktion von entfettetem CC-Extrakt wurde ein Aliquot von 20 CC nach jedem Reinigungsschritt entnommen und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit 800 µl Wasser aufgenommen, mit 200 µl Proteinreagenz versetzt und der Proteingehalt durch Absorption bei 595 nm gemessen.

In einer biologisch aktiven HPLC-Fraktion wurde die Peptidmenge durch Absorption der Säureamidbindung bei 206 nm ($E = 4 \times 10^4$) bzw. durch Aminosäureanalyse näherungsweise bestimmt. Die Hydrolyse erfolgte in der Gasphase nach der Methode von Tsugita und Mewes⁸⁴. Dazu wurden 0,02 - 0,5 µg Peptid in einem 400 µl Probenröhrchen (aus Glas) getrocknet und in ein Reagenzglas eingeführt, in dem sich 100 µl Hydrolyseflüssigkeit (7,2 N HCl, 10 % TFA, 0,1 % Phenol, 10 mg/ml Cystein) befanden. Dieses Glasröhrchen wurde im Vacuum unter Trockeneiskühlung eingeschmolzen (250 mTorr). Die Hydrolyse wurde in einem Ölbad bei 159 °C während 20 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die abgekühlte Probe mit o-Phthaldehyd bei pH 10 derivatisiert. Die Derivate wurden mittels HPLC (Reversed phase) getrennt und durch Fluoreszenzmessung quantifiziert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Corpus allatum in vitro-Test

Der Aufbau des Kohlenstoffgerüsts von JH-III folgt auch bei den Insekten dem bekannten Sesquiterpenoid-Biosyntheseweg⁸⁵. Farnesylpyrophosphat wird durch eine Pyrophosphatase oder Phosphatase in den freien Alkohol umgewandelt, der über den Aldehyd (Farnesal) zur entsprechenden Säure (Farnesensäure) oxidiert wird^{86,87}. Die Reihenfolge bei der Veresterung und Epoxidierung ist je nach Insekt verschieden (Abb. 4). Bei Manduca sexta (Lepidoptera), einem holometabolen Insekt, wird die Farnesensäure zunächst in die Epoxyfarnesensäure (JH-III-Säure) umgewandelt⁸⁸. Die anschließende Veresterung der Säure erfolgt durch eine O-Methyl-Transferase, wobei S-Adenosylmethionin als Kofaktor dient⁸⁶. Bei Locusta migratoria (Orthoptera) wird die Farnesensäure zuerst zu Methylfarnesoat verestert und erst dann durch Methylfarnesoat-Epoxidase - eine Monooxygenase, die an Cytochrom P-450 gebunden ist und NADPH als Kofaktor gebraucht - epoxidiert^{71,89}. Der von Pratt und Tobe^{70,71} eingeführte in vitro-Test der Corpora allata beruht auf dem Einbau der ¹⁴C-Methylgruppe aus Methionin in die Juvenilhormonsäure bzw. in die Farnesensäure. Das auf diese Weise gebildete radioaktive JH wird als Maß für die Aktivität der CA gewertet. Der CA-Test - die Inkubation von isolierten CA oder von CA-Homogenat - hat sich bereits bei verschiedenen Arbeitsgruppen als Routinetest durchgesetzt. Er dient u. a. zur Untersuchung einer Steuerung der JH-Synthese durch nervöse Verbindungen bzw. durch hormonelle Faktoren, der an der JH-Biosynthese beteiligten Enzyme und für Bindungs- und Rezeptorstudien mit JH-III.

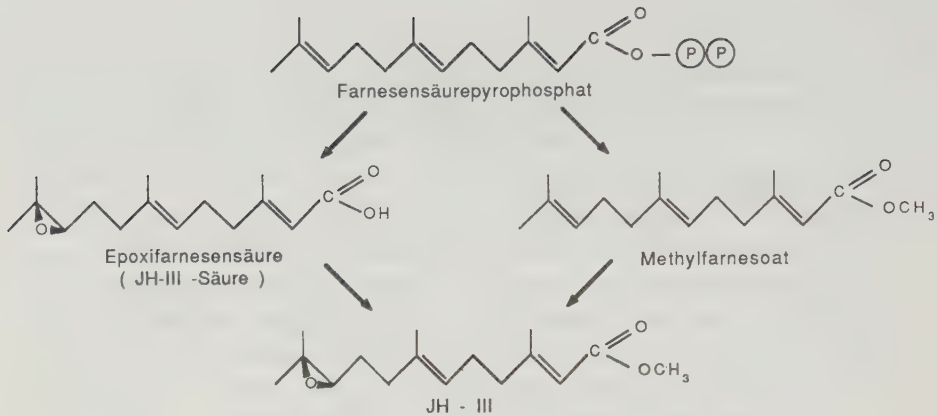


Abb. 4 Biosynthese des Juvenilhormon-III

3.1.1 Untersuchung verschiedener Kulturmedien und Zusätze

Für die CA-Inkubation stehen eine Reihe käuflicher und selbst herzustellender Kulturmedien zur Verfügung. Die Grundaktivität isolierter CA wurde in Landureau⁷⁷, in Serva-MEM- und in Boehringer-MEM-Medium⁷⁶ sowie in Medium 199⁷⁸ jeweils während 3 Stunden gemessen (Unterschiede der Medien s. Kap. 2.2). In Abbildung 5 sind die CA-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Länge der terminalen Oocyten (LTO) für die verschiedenen Inkubationsmedien zusammengefaßt. Die Werte umfassen den ersten Eireifungszyklus (LTO 3,5 mm bis fertige Eier) und den Anfang des zweiten Eireifungszyklus (LTO 1,5 - 3,0 mm) bei den Weibchen und die CA-Aktivitäten von geschlechtsreifen Männchen. Im Landureau- und im Serva-MEM-Medium lagen über 90 % der CA-Syntheseleistungen unter 20 pmol JH-III/CA-Paar x 3 h. Im Schnitt waren die höchsten Spontanaktivitäten der weiblichen CA bei 20,6 pmol im Boehringer-MEM-Medium und bei 19,2 pmol JH-III/CA-Paar im Medium 199. Auffällig ist, daß bei

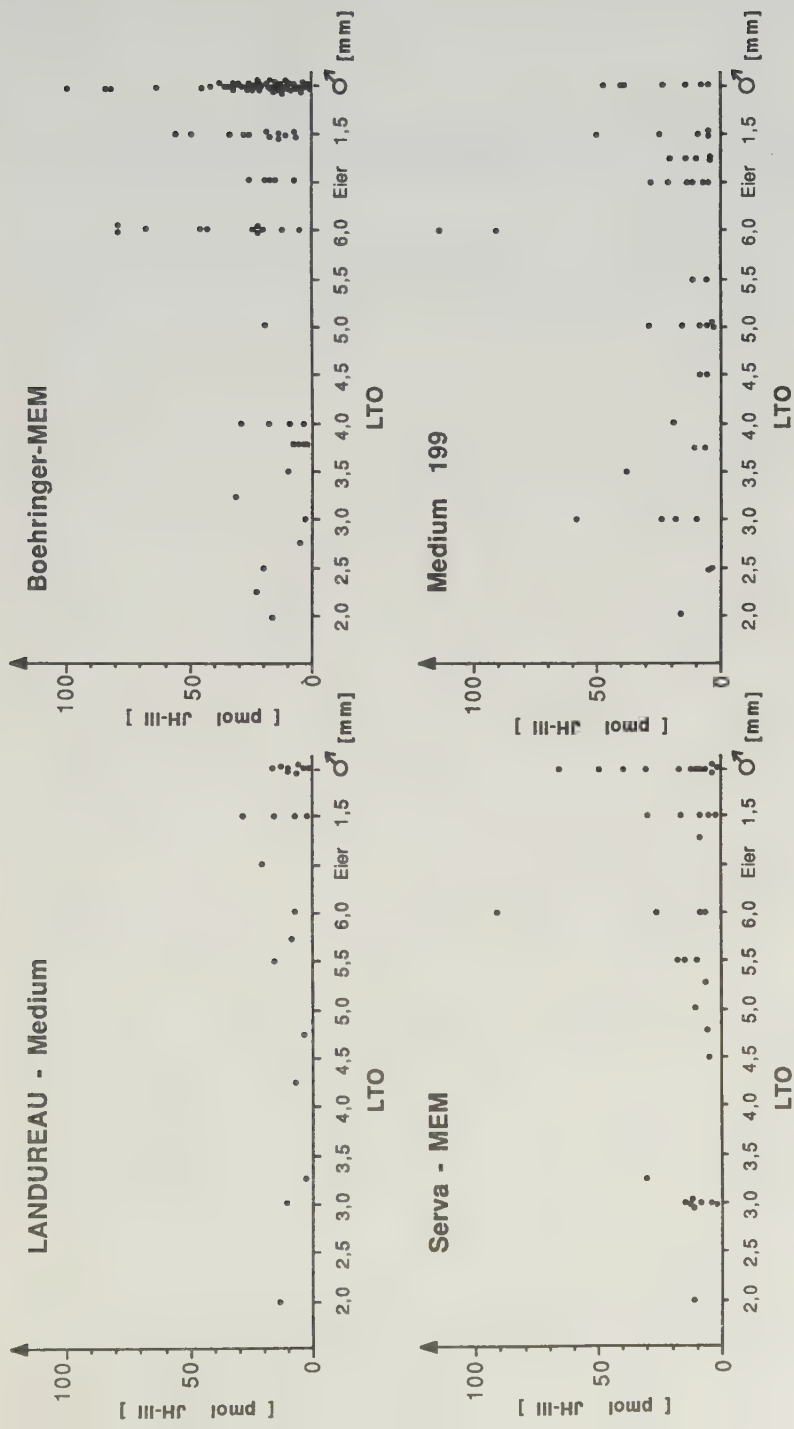


Abb. 5 Vergleich der vier Inkubationsmedien während des ersten Eireifungszyklus (LTO in mm). Angegeben sind die JH-III-Werte (in pmol), die in 3 Stunden Inkubationszeit von den CA in vitro synthetisiert wurden.

Weibchen mit einer LTO zwischen 6,0 und 1,5 mm überdurchschnittlich hohe Werte gemessen wurden. Dies galt für alle getesteten Medien.

Teilte man deshalb die Testergebnisse bei den Weibchen in zwei Gruppen, eine mit LTO 2,0 - 5,5 mm (erster Eireifungszyklus) und eine mit LTO 6,0 - 1,5 mm (Ende des ersten Eireifungszyklus, Eiablage und Beginn des zweiten Eireifungszyklus), konnten für die 3 Stunden-Inkubation in den verschiedenen Medien Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen angegeben werden (Tab. 2). Der mittlere Fehler war in der Gruppe mit LTO 6,0 - 1,5 mm besonders hoch. Dies ist auf den drastischen Abfall der CA-Aktivität kurz vor der Oviposition und den gleich darauffolgenden Beginn einer hohen Syntheseleistung der CA zurückzuführen. Weitere Einzelheiten dazu sind im Kapitel 3.3.2 beschrieben.

Tabelle 2 JH-III-Synthese von CA aus adulten Männchen bzw. Weibchen während des ersten und Beginn des zweiten Eireifungszyklus (LTO in mm). JH-III-Werte wurden nach 3 Stunden Inkubationszeit gemessen (Mittelwert und Standardabweichung, n = Anzahl der getesteten CA-Paare).

Medium	Weibchen			Weibchen			Männchen		
	n	LTO 2,0-5,5		n	LTO 6,0-1,5		n		
Landureau	7	9,3 ± 4,5		6	13,6 ± 9,0		7	7,5 ± 4,4	
Serva-MEM	16	10,6 ± 6,2		10	20,3 ± 24,8		12	20,0 ± 20,2	
Boehr.-MEM	16	13,7 ± 9,2		28	25,0 ± 15,0		42	22,2 ± 22,8	
Medium 199	20	14,4 ± 13,4		16	27,2 ± 31,1		7	22,4 ± 13,4	

Auch die CA von Locusta-Männchen zeigen mit durchschnittlich 22,4 pmol JH-III/CA-Paar x 3 h im Boehringer-MEM- und

im Medium 199 die höchsten Biosyntheseraten. Die sehr unterschiedliche Syntheseleistung in vitro läßt vermuten, daß auch die CA-Aktivität der Männchen einem gewissen Zyklus unterliegt. Darauf soll aber nicht näher eingegangen werden. Um die in unserem Labor erzielten Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen^{71,87,90,91} vergleichen zu können, wurde für alle weiteren biologischen Tests das Medium 199 verwendet.

Wie von Feyereisen et al.⁸⁷ beschrieben, wird durch Zusatz von Farnesol die Syntheseaktivität von isolierten D. punctata-CA gesteigert. Ebenso wird von Tobe et al.^{71,90} über eine Steigerung der JH-Biosynthese in vitro durch Farnesensäure, einer potentiellen Vorstufe des JH-III, berichtet. Wegen ihrer Licht- und Sauerstoffempfindlichkeit wurde Farnesensäure im Routine-CA-Test, der für die Anreicherung des ATH verwendet wurde, nicht eingesetzt. Um die Inkubationsbedingungen weiter zu optimieren, wurde die JH-Produktion der CA im Medium 199 ohne und mit 200 µM Farnesol während 24 Stunden getestet.

Der Farnesolzusatz steigerte die CA-Aktivität in Langzeitinkubationen um das Dreifache (Abb. 6). Nach anfänglich guten Erfolgen bei Farnesolzusatz, auch bei Aktivierungsversuchen mit CC-Extrakt (s. Kap. 3.5.2, Tab. 10), ließ sich später die stimulierende Wirkung auf die JH-Synthese nicht mehr reproduzieren. Bei der Bestimmung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung unter Verwendung von über LiChroprep RP8 gereinigtem CC-Extrakt wurde kein wesentlicher Unterschied in Medium mit und ohne Farnesolzusatz festgestellt (Tab. 3). Die CA erreichten ihr Aktivitätsmaximum in vitro bereits bei einem CC-Äquivalent; es hielt sich nach Zugabe von 2, 3 oder 5 Äquivalenten auf einem Plateau. Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve bei Medium mit Farnesolzusatz war dem bei Medium ohne Farnesolzusatz äquivalent. Die absoluten Zuwachsraten von JH-III in pmol/4 h (nach 2 Stunden Präinkubation) lagen aber

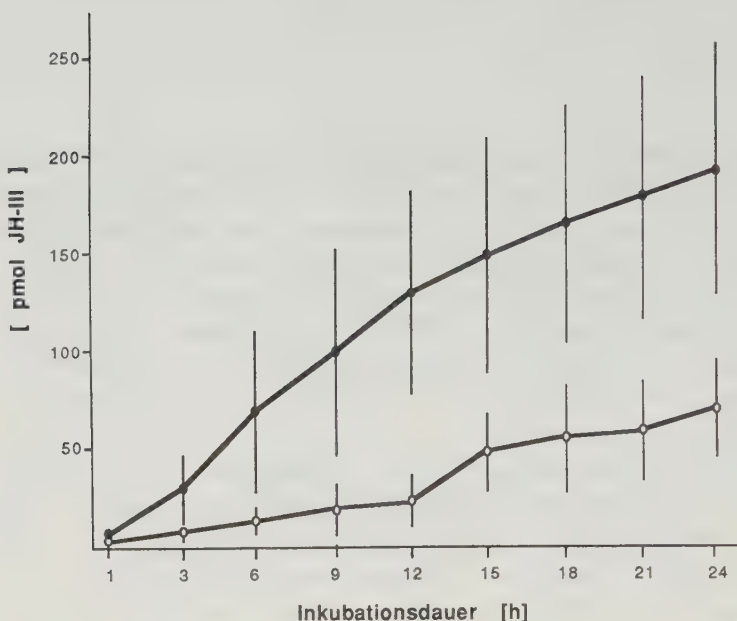


Abb. 6 JH-III-Synthese der *Locusta*-CA in vitro im Verlauf von 24 Stunden in Medium 199 mit (●) und ohne (○) Farnesol. Alle 3 Stunden wurde die Hälfte des Mediums für die JH-Messung entnommen und durch frisches, ^{14}C -Methionin enthaltendes Medium ersetzt (Mittelwerte aus 6 CA-Paaren und Standardabweichung).

im Farnesol enthaltenden Medium nur geringfügig höher. Ein Farnesolzusatz brachte nach diesen Ergebnissen also keine wesentliche Steigerung der spontanen und aktivierbaren CA-Syntheseleistung.

Eine Zunahme von intrazellulärem cAMP bewirkt nach Meller⁹² eine rasche und dosisabhängige Inhibition der JH-Biosynthese in *D. punctata*-CA. Dem Nucleotid wird dabei eine mögliche Rolle als second-messenger zugeschrieben. Die Zugabe von cAMP zum Inkubationsmedium (mit oder ohne Farnesol) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die CA-Aktivität in vitro (Tab. 4). cAMP stabilisierte aber die CA-Aktivitäten so weit, daß die einzelnen Werte nicht mehr so stark differierten. In der Anfangsphase der Optimierung des CA-Testes wurde deshalb mit Zusatz sowohl von Farnesol als auch von cAMP gearbeitet.

Tabelle 3 Dosis-Wirkungskurve der JH-III-Synthese mit CC-Extrakt (über LiChroprep RP8 gereinigt) in Medium 199 mit und ohne Farnesolzusatz. Nach 2 Stunden Präinkubationszeit*) wurde gereinigter CC-Extrakt mit dem Medium zugegeben. Angegeben ist die JH-III-Synthese nach weiteren 4 Stunden Inkubationszeit.

CC- Äqui- valente	mit 200 µM Farnesol		ohne Farnesol	
	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h
0	4	11,9 ± 8,6	4	6,8 ± 5,2
1	3	33,3 ± 12,0	3	23,0 ± 8,7
2	3	26,9 ± 9,1	2	20,3 ± 0,9
3	3	21,5 ± 5,2	3	18,2 ± 3,2
5	4	26,5 ± 4,3	2	19,6 ± 8,3

Tabelle 4 Einfluß von cAMP und Farnesol auf die JH-III-Biosynthese von CA in vitro. Angegeben ist die mittlere JH-III-Synthese zwischen 3 und 9 Stunden Inkubationszeit (Med = Medium)

Medium	n	pmol JH-III/CA-Paar x 6 h
Medium 199	7	22,9 ± 11,5
Medium 199 + cAMP	3	19,8 ± 8,1
Medium 199 + Farnesol	8	35,3 ± 19,4
Med 199 + cAMP + Farnesol	13	34,0 ± 12,5

*) Die Präinkubation umfaßte die Zeit vom Inkubationsbeginn (im Medium mit ^{14}C -Methionin) bis zur ersten Zugabe von (fraktioniertem) CC-Extrakt. Die JH-III-Synthese der Kontroll-CA wurde in Medium ohne Extrakt gemessen.

3.1.2 Auswahl der Testtiere

Temperatur, Tag-Nacht-Rhythmus (Photoperiode), Luftfeuchtigkeit, Populationsdichte und Futterangebot⁹³ spielen bei der Entwicklung der Insekten eine wichtige Rolle. Hell-Dunkelrhythmus mit den entsprechend wechselnden Temperaturen verlängert im Vergleich mit konstanter Beleuchtung (s. Kap. 3.3.2) den ersten Eireifungszyklus bei Locusta migratoria um 3 - 5 Tage⁹⁴. Um ein möglichst homogenes Tiermaterial (gleicher Entwicklungszustand) zu erhalten, wurden die frisch geschlüpften adulten Locusta-Weibchen im Abstand von 8 und 16 Stunden gesammelt und in einem eigenen Käfig zusammen mit älteren Männchen gehalten. Im vorhergehenden Kapitel ist die in vitro-Synthese von JH-III im 3 Stunden-Test während des ersten und des beginnenden zweiten Eireifungszyklus beschrieben (Tab. 2 und Abb. 5). Für die gleiche Entwicklungsphase wurde die CA-Aktivität in einer 6 Stunden-Inkubation durch Bestimmung des JH-III mit der GC-MS-Methode gemessen (s. Kap. 3.3.2). Dabei wurde im wesentlichen der Verlauf der CA-Aktivität während der Eireifung, der durch Messung des ¹⁴C-JH-III ermittelt wurde, bestätigt. Auffällig war, daß Weibchen mit reifenden Oocyten sehr unterschiedliche CA-Aktivitäten besaßen. Auch Pratt et al.^{95,96} und Pener⁹⁷ berichten von ähnlich großen Schwankungen, die sie auf unterschiedliche biologische Grundzustände der einzelnen Tiere zurückführen. Eigene Versuche und Versuche von Pener^{96,97}, die Entwicklung der Einzeltiere zu synchronisieren, erzielten nicht das gewünschte Resultat. Grundsätzlich kann zwischen CA mit hoher und CA mit geringer Spontanaktivität (Grundaktivität) unterschieden werden⁹⁵ (Abb. 5). Der Verlauf der JH-Abgabe während 3 Stunden, dargestellt in Abbildung 7, soll dies belegen. Dabei wurde das in das Medium 199 abgegebene radioaktive JH-III nach 45, 90, 135 und 180 Minuten gemessen. CA mit hoher Anfangsaktivität erreichten nach 180 Minuten die höchste Syntheserate, während CA mit geringer Anfangsaktivität ihre Synthese kaum steigern

konnten und am Ende der Inkubation nur geringe JH-Mengen aufwiesen. Bei Aktivierungsversuchen mit biologisch aktivem Material wurden nur die CA berücksichtigt, deren spontane JH-III-Synthesen während der Präinkubationszeit vergleichbar waren.

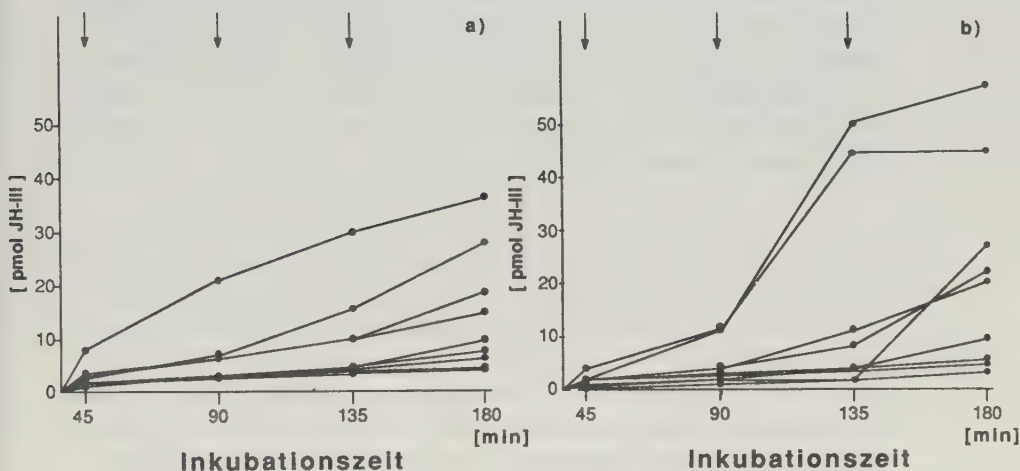


Abb. 7 Verlauf der JH-III-Synthese während einer 3 Stunden-Inkubation (in Medium 199). Die CA-Spenderinnen besaßen Oocyten der Länge 2,0 - 5,5 mm (erster Eireifungszyklus (a)) und 6,0 - 1,5 mm (Ende des ersten und Beginn des zweiten Eireifungszyklus (b)). Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Probenentnahme und den Zusatz eines gleichen Volumens Inkubationsmedium an.

Der unterschiedliche biologische Grundzustand der einzelnen Tiere gleichen Alters ist also die Ursache für die z. T. große Standardabweichung bei den Durchschnittswerten der Testergebnisse. Bei *Manduca sexta*-Larven, die ebenfalls eine endokrine Asynchronie^{98,99} besitzen, wird beim CA-Test jedes CA aus einem einzelnen Tier getrennt inkubiert. Das eine CA wird mit biologischem Extrakt aktiviert und das andere dient als Kontrolle⁹⁸. Das Problem, homogene und aktivierbare CA zu erhalten, kann bei den Wanderheuschrecken

nicht durch Trennung der CA-Paare und Einzelinkubation gelöst werden. Ferenz und Kaufner¹⁰⁰ fanden in Locusta migratoria, daß das eine CA aus dem gleichen Spender wesentlich mehr JH-III synthetisierte als das andere. Ebenso besaßen die CA eines Tieres unterschiedliche Volumina. Die Autoren konnten aber keine Beziehung zwischen Volumen und Syntheserate der CA ermitteln. In der Familie der Orthopteren wurde auch in Schistocerca gregaria, einem Locusta migratoria nahe verwandten Insekt, eine deutliche Asymmetrie der JH-III-Biosynthese durch die CA eines Individuums gefunden¹⁰¹.

Die CA-Aktivitäten von Weibchen um den Zeitpunkt der Eiablage waren sehr inhomogen (s. Abb. 7b), die von Weibchen mit reifenden Oocyten (LTO 2,0 - 5,5 mm, s. Abb. 7a) gleichmäßiger. Die JH-III-Biosynthese beider Altersgruppen ließ sich mit biologisch aktivem Material (Sephadex LH20-Fractionen, s. Tab. 10) stimulieren. Noch geringere Streuungen der spontanen Syntheseraten hatten CA aus jungen Testtieren (Prävitellogenese), die während der 6 Stunden-Inkubation auf ihre Aktivierbarkeit durch ATH getestet wurden (Tab. 5). Dazu wurden 6 CC-Äquivalente (Fraktion C-2 nach Sephadex G15-Reinigung, s. Kap. 3.4.2) nach 2 Stunden Präinkubation zugesetzt. CA aus einem Tag alten Spenderinnen waren mit einem aktiven CC-Extrakt nicht stimulierbar; sie produzierten die gleiche JH-III-Menge wie die Kontrollen. CA, deren Spenderinnen 3 Tage alt waren, steigerten dagegen mit der gleichen Extraktmenge ihre Produktion auf fast das Doppelte der Kontrollen. Diese CA schienen für eine Aktivierung am besten geeignet zu sein. In allen weiteren Biotests, die für die Anreicherung des Allatotropins notwendig waren, wurden deshalb CA aus 2 - 3 Tage alten weiblichen Wanderheuschrecken verwendet.

Tabelle 5 In vitro-Aktivierung mit Fraktion C-2 (der Sephadex G15-Reinigung) von CA aus jungen Spenderinnen. Es wurde 2 Stunden präinkubiert und dann die Zuwachsrates in pmol JH-III/CA-Paar nach weiteren 4 Stunden bestimmt.

Alter	Kontrolle		Fraktion C-2	
	n	pmol JH-III/4 h	n	pmol JH-III/4 h
Tag 1	6	34,9 ± 9,8	3	35,4 ± 5,7
Tag 3	4	34,5 ± 5,4	3	56,3 ± 3,4

3.1.3 Optimierung der Inkubationsdauer

3.1.3.1 3 Stunden-Inkubation

Der allgemein angewandte in vitro-Test nach Pratt und Tobe^{70,71} dauert 3 Stunden. Während dieser Inkubationszeit lassen sich Spontanaktivitäten isolierter CA gut testen, wie auch der in Abbildung 7 dargestellte Verlauf der JH-Abgabe zeigt. Versuche, die CA-Aktivität während der 3 Stunden-Inkubationszeit durch Zugabe von CC-Organen oder CC-Extrakten zu erhöhen, schlugen fehl. In Abbildung 8 ist als Beispiel die Aktivierung mit entfettetem CC-Extrakt dargestellt. Die Aktivität der CA blieb unter dem Einfluß des CC-Extrakts gleich oder wurde sogar leicht reduziert. Zudem war ein Wechsel des Mediums (bzw. eine Aktivierung mit CC-Material) nach 45 oder 60 Minuten arbeitstechnisch nur schwer durchführbar, da für 14 - 16 CA-Präparationen bereits 45 Minuten nötig waren.

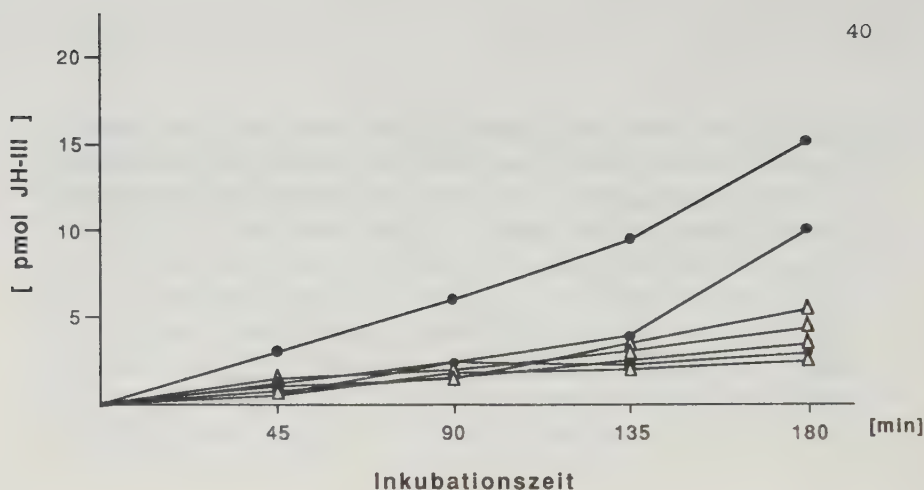


Abb. 8 Verlauf der JH-III-Synthese während 3 Stunden Inkubationszeit. Nach 45, 90 und 135 Minuten wurde den CA jeweils ein entfetteter Extrakt von ca. zwei CC mit dem Inkubationsmedium zugegeben. CA mit CC (Δ); Kontroll-CA (●).

3.1.3.2 6 Stunden-Inkubation

Während eines 6 Stunden-Testes wurde den CA nach zwei Stunden aktiver Extrakt, der im Medium gelöst war, zugesetzt. Bis zum Ende der Inkubation erfolgte keine weitere Behandlung der CA. Ergebnisse dazu sind überwiegend in Kapitel 3.5.3 dargestellt.

3.1.3.3 9 Stunden-Inkubation

Die Aktivierbarkeit der CA mit Sephadex-Fractionen aus CC-Extrakt wurde in einem Zeitraum von 9 Stunden verfolgt. Nach einer Präinkubation von einer Stunde wurde dem Medium zum ersten Mal biologisch aktives Material zugesetzt. Weitere Zugaben fanden nach 3 und 6 Stunden statt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.5.2 beschrieben.

3.1.3.4 24 Stunden-Inkubation

Erst nach einer Versuchsdauer von 24 Stunden wurde die Syntheseleistung der CA durch Allatotropin deutlich stimuliert. Bei vier getrennten CA-Paaren wurden nach einer Stunde Präinkubation zwei CC und nach einer weiteren Stunde nochmals zwei intakte CC zugesetzt. Abbildung 9 zeigt, daß nach 3 Stunden Gesamtinkubationsdauer noch keine Aktivierung durch die zugegebenen CC-Organen festzustellen war. Zwischen 3 und 24 Stunden wurde das Medium nicht erneuert und keine Probe für die JH-Messung entnommen. Während die JH-Abgabe ins Medium durch die Kontroll-CA weiterhin ziemlich linear verlief, gaben die aktivierten CA eine deutlich höhere JH-Menge in das Medium ab (s. Kap. 3.5.1).

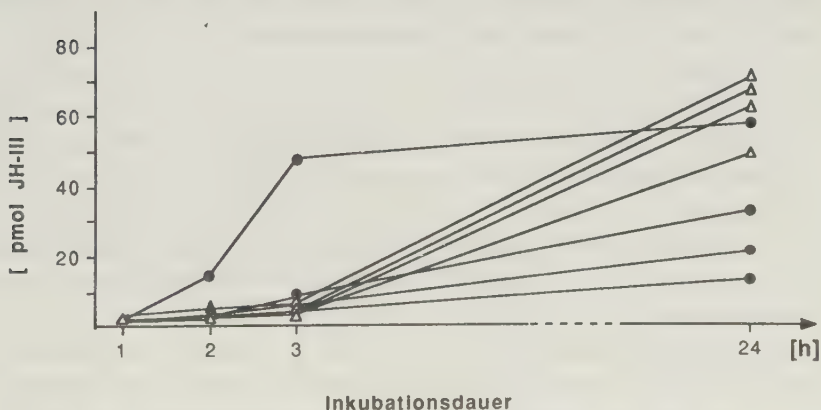


Abb. 9 JH-III-Synthese in vitro (in pmol) während 24 Stunden Inkubationszeit. Nach 1, 2 und 3 Stunden wurden 4 CA-Paare durch Zugabe von jeweils 2 intakten CC aktiviert. CA mit CC (Δ); Kontroll-CA (●).

Eine Kinetik für die 24 Stunden-Inkubation der CA (s. Kap. 3.1.1 mit Abb. 6), bei der in 3 Stunden-Abständen radioaktives JH-III gemessen wurde, zeigt einen kontinuier-

lichen Anstieg der CA-Syntheseleistung innerhalb von 15 Stunden. Die dabei am Inkubationsende bestimmte JH-Menge war deutlich höher als der JH-Gehalt, der nach einer Langzeitinkubation ohne Mediumwechsel (Abb. 9) erzielt wurde. Außerdem sank nach 12 - 15 Stunden der pH-Wert im Medium trotz des Hepes-Puffers ab (Äquivalenzpunkt der verwendeten Pufferkonzentration bei pH 5.4 - 5.5), was auf eine Verschlechterung der Versuchsbedingungen hinwies.

Zusammenfassend konnte der CA-Test anhand folgender Kriterien weiter vereinfacht werden.

- Da die 1 Stunden-Werte in der Regel sehr gering waren und das gleichzeitige Testen mehrerer Fraktionen (Operationszeit) ermöglicht werden sollte, wurde die erste Probenentnahme und der Zusatz von fraktioniertem CC-Extrakt erst nach 2 Stunden vorgenommen (Präinkubationszeit).

- Die Differenz zwischen aktivierten CA und Kontroll-CA war nach 6 Stunden konstant. Deshalb erschien eine Verkürzung der Inkubationszeit von 9 auf 6 Stunden sinnvoll.

- Eine einmalige Aktivierung mit biologisch aktivem Material war für eine Stimulierung der CA-Aktivität ausreichend (s. Kap. 3.5.3).

Um CA mit hoher und geringer Spontanaktivität - besonders im Hinblick auf eine Stimulierung - zu erkennen, empfahl es sich, eine Präinkubationszeit von zwei Stunden beizubehalten. Durch eine geringere Gesamtinkubationsdauer und die längere Präinkubationszeit (verbunden mit einer einmaligen Aktivierung) konnte die Anzahl der zu reinigenden Proben pro Inkubationsansatz verringert werden (2 Proben/CA-Paar). Eine einmalige Aktivierung reduzierte außerdem das für die Inkubation benötigte CC-Material beträchtlich.

3.2 Reinigung und Derivatisierung von JH-III

3.2.1 Austesten verschiedener Reinigungsmethoden für ^{14}C -JH-III

Die von Tobe und Pratt⁷¹ beschriebene Reinigung von radioaktivem JH-III aus dem in vitro-Testansatz erfordert eine Extraktion mit anschließender Dünnschichtchromatographie. Letztere erwies sich als so leistungsfähig, daß es möglich war, das Inkubationsmedium ohne Vorreinigung zu chromatographieren. Das ins Medium abgegebene ^{14}C -JH-III aus allen 3, 9 und 24 Stunden-Tests wurde auf diese Weise von ^{14}C -Methionin und anderen radioaktiven Stoffen getrennt. Als Träger- bzw. Referenzsubstanz wurde unmarkiertes, synthetisches JH-III verwendet (s. Kap. 2.5.1). Das Auftragen von 50 µl Testmedium stellte sich aber als mühsam und relativ zeitraubend heraus, zumal das Trocknen der Flecken unter kaltem Luft- oder Stickstoff-Strom zu unbestimmbaren JH-Verlusten führte. Eine weitere Schwachstelle im TLC-Reinigungsverfahren für den Routinetest war die rasche Zersetzung des JH-III, falls die DC-Platten nicht innerhalb von ca. 30 Minuten zum Entwickeln in die Chromatographiekammern gebracht waren.

Feyereisen et al.¹⁰² beschreiben eine andere Reinigungsmethode für das radioaktiv markierte JH-III. Das Inkubationsmedium wird dreimal mit Isooctan extrahiert und die beiden Phasen werden durch Zentrifugieren getrennt. Gleichzeitig extrahiertes ^{14}C -Methionin wird aber bei der Messung der Radioaktivität ebenfalls erfaßt. In einem Blindversuch muß deshalb bei jedem CA-Test die Menge des in die organische Phase verschleppten Methionins bestimmt werden. Mit diesem Wert werden die für den Isooctan-Extrakt gemessenen Counts pro Minute (cpm) korrigiert. Trotz größter Sorgfalt bei der Versuchsdurchführung wurden bei den vorliegenden Versuchen ca. 0,03 % des eingesetzten

Methionins verschleppt, was auch etwa dem von Feyereisen et al.¹⁰² angegebenen Wert entsprach. Während die radioaktiven Zerfälle für das JH-III in einer Probe mit durchschnittlich 100 - 400 cpm bestimmt wurden, lagen sie für das verschleppte Methionin bei 600 - 800 cpm. Wegen ihrer ungenügenden Selektivität für JH-III ist deshalb die JH-Isolierung durch einfache Extraktion mit Isooctan unbrauchbar; die Empfindlichkeit der Messung ist dann besonders für die Auswertung geringer Mengen des ^{14}C -JH-III nicht ausreichend.

Für die Aufarbeitung des ins Medium abgegebenen JH-III wurde deshalb nach einer schnell arbeitenden Methode gesucht, mit der routinemäßig die große Zahl der anfallenden Proben bewältigt werden konnte. Es lag nahe, alle radioaktiven Substanzen, die nicht mit ^{14}C -JH-III identisch waren, mit Hilfe der JH-Reinigungsmethode, wie sie für die GC-MS-Messung angewandt wird, abzutrennen. Das ^{14}C -Methionin enthaltende Kulturmedium wurde, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, über LiChroprep RP8 gereinigt. Das Methanol-eluat wurde mit NaCl-Lösung verdünnt und mit Pentan ausgeschüttelt. Anschließend wurde der Pentanextrakt über Aluminiumoxid getrocknet. 80 - 90 % des nicht umgesetzten ^{14}C -Methionins wurden so bei der RP-Reinigung entfernt, der Rest blieb nach der Extraktion des JH-III mit Pentan (aus dem verdünnten Eluat) im wässrig-methanolischen Rückstand. Die Abtrennung der störenden ^{14}C -markierten Substanzen wurde mit TLC überprüft. Ein Aliquot des aufzuarbeitenden Inkubationsmediums (ohne ^3H -JH-III-Standard) aus dem CA-Test und jeweils ein Äquivalent nach den einzelnen Reinigungsschritten wurden auf einer HPTLC-Kieselgelplatte chromatographiert (Abb. 10a - d). Nach dem letzten Reinigungsschritt war nur noch radioaktives JH-III zu erkennen (Abb. 10d); dies zeigte ein Vergleich der R_f -Werte mit reinem ^3H -JH-III (Abb. 10e), das als Referenzsubstanz aufgetragen wurde. Es konnte deshalb auf eine zusätzliche Derivatisierung des JH-III, wie sie für die Messung mit dem Massenspektrometer

nötig war, verzichtet werden. Bei der Routineaufarbeitung wurde in jeder einzelnen Probe der ^{14}C -JH-III-Verlust durch Zusatz eines inneren Standards (^3H -JH-III) gesondert bestimmt. Die Ausbeute, gemessen mit tritiiertem JH-III, lag immer zwischen 80 und 90 %.

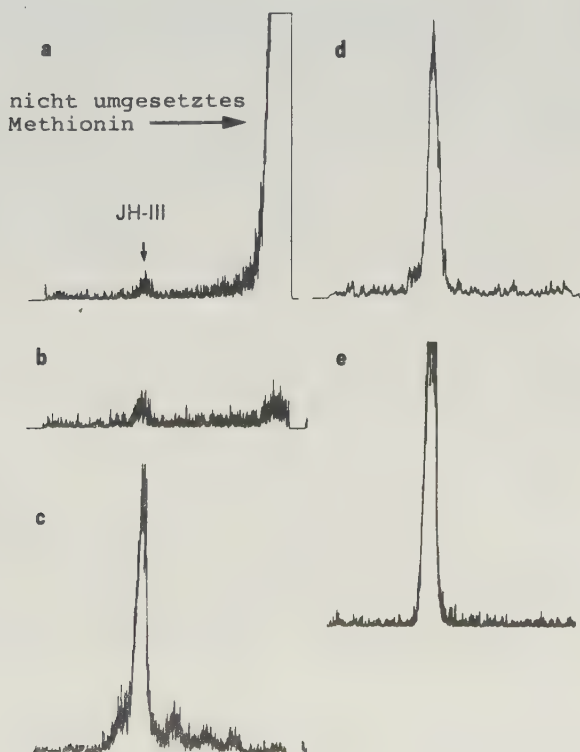


Abb. 10 HPTLC-Chromatogramme von ^{14}C -JH-III nach den einzelnen Reinigungsschritten während der Isolierung aus dem Inkubationsmedium: Inkubationsmedium (a), nach der LiChroprep RP8-Reinigung (b), nach der Extraktion (c), nach dem Trocknen an Al_2O_3 (d), Referenzsubstanz ^3H -JH-III (e). Als Laufmittel wurde Ethylacetat/n-Hexan (1:1) verwendet.

3.2.2 Verluste bei der Reinigung von nativem JH-III zur Bestimmung im Massenspektrometer

Für die empfindliche GC-MS-Messung im Bereich von Picomolen JH-III (die Nachweisgrenze liegt bei 100 Femtogramm oder ca. 0,1 Picomol) wird JH-III zu einer Verbindung mit höherem Molekulargewicht derivatisiert und möglichst vollständig von unerwünschten Nebenprodukten der Reaktionen abgetrennt^{44,45}. Die Aufarbeitung der biologischen Proben wurde nach dem Schema auf Seite 47 durchgeführt.

In Abbildung 11 sind die Reaktionsprodukte der Methoxyderivatisierung und der Silylierung schematisch dargestellt. Im Massenspektrometer (unter MIS-Bedingungen) wird für JH-III das Signal m/z 376 (nach ca. 1 min) mit Hilfe des JH-III-Ethylesters (nach ca. 1 min 30 s) quantifiziert.

Die Reinigungsprozedur war bei Hormonmengen im Bereich von Picomolen mit JH-III-Verlusten verbunden, die in der folgenden Tabelle 6 zusammengefaßt sind.

Tabelle 6 Mittlere Verluste bei einer Aufarbeitung von 7,25 bzw. 14,5 ng (54,6 pmol) JH-III. Messung unter Verwendung von ³H-JH-III als innerem Standard.

Reinigungsschritt	Verlust in %
LiChroprep RP8	1
Extraktion mit Pentan oder Isooctan	2,6
Al ₂ O ₂ -Reinigung (Methylenchlorid)	4
Methoxyderivatisierung	5
Al ₂ O ₃ -Reinigung (Essigester)	0,2
Al ₂ O ₃ -Reinigung nach Silylierung	16
Gesamtverlust an JH-III	28,8

Schema Herstellung des JH-Analyten aus biologischen Proben

Hämolymphe, CA-Homogenat oder Kulturmedium in 2 ml Methanol, Verdünnen mit 2 ml 2 % NaCl-Lösung

- LiChroprep-Reinigung (0,5 g LiChroprep RP8): Zweimaliges Waschen mit jeweils 2 ml Methanol/2 % NaCl-Lösung (1:1) und dann Eluieren der JH enthaltenden Fraktion mit 2 ml Methanol

- Extraktion des Methanols nach Zugabe von 2 ml NaCl-Lösung (2 %) mit Pentan oder Isooctan (dreimal mit 0,5 ml), Waschen des Extraktes mit 0,25 ml 2 %-NaCl-Lösung

- Aluminiumoxid-Reinigung: Nach dem Auftragen des Pentanextraktes (1,5 ml), Spülen mit zweimal 1 ml Methylenchlorid/Pentan (3:7), Elution mit 2 ml Methylenchlorid und Trocknen des Eluats im Helium-Strom

- Methoxyderivatisierung: Lösen in 0,15 ml trockenem TFA-haltigem Methanol und Reaktion bei 60 °C während 15 Minuten; Verdünnen mit zweimal 1 ml Pentan, Entfernen des Lösungsmittels unter Helium und Wiederholung mit 1 ml Pentan

- Aluminiumoxid-Reinigung: Lösen des Rückstandes in 1 ml Isooctan, Waschen des adsorbierten JH-Derivates mit 1 ml Isooctan und 2 ml Methylenchlorid, Eluieren mit 2 ml Essigester/Pentan (1:1) und Trocknen des Eluats unter Helium

- Derivatisierung zu 10-DMNFHS-11-methoxy-JH: Lösen des Rückstandes in 0,1 ml Pyridin (getrocknet) und Zugeben von 0,025 ml DMNFHSC, Inkubation während 20 Minuten bei 60 °C; anschließend Verdünnen mit 1 ml Pentan

- Filtration des Reaktionsgemisches über Aluminiumoxid (0,2 g) und Nachspülen mit 1 ml Methylenchlorid/Pentan (2:3), Entfernen des Lösungsmittel im Heliumstrom, Zugeben von dreimal 1 ml Pentan, das jedes Mal unter Helium entfernt wird

- Aluminiumoxid-Reinigung: Lösen des Rückstandes in 1 ml Isooctan, Waschen der adsorbierten JH-Derivate mit 1 ml Isooctan, 2 ml Toluol/Isooctan (15:85) und 0,5 ml Pentan; Eluieren mit 2 ml Methylenchlorid/Pentan (2:3), Entfernen des Lösungsmittels unter Helium

- Aluminiumoxid-Reinigung: wie vorhergehende Aluminiumoxid-Reinigung

- Lösen des Rückstandes in 50 µl Cyclopentan

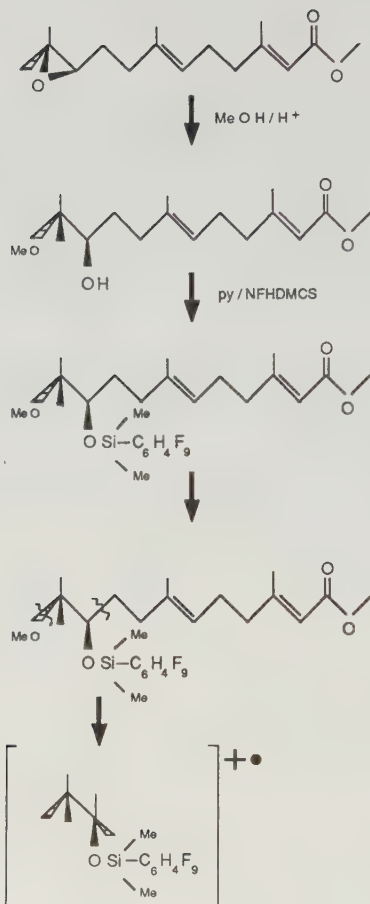


Abb. 11 Formelschema für die Synthese des JH-III-Analyten. Das unten angegebene Fragment entsteht bei Elektronenstoßionisation.

Die erste Filtration des underivatisierten JH-III über Al₂O₃ war mit einem Substanzverlust von ca. 4 % (bzw. 290 pg bei eingesetzten 7,25 ng, s. Tab. 6) verbunden. Im Gegensatz dazu traten bei der Al₂O₃-Reinigung, bei der mit Ethergemischen gewaschen und eluiert wurde (s. Kap. 2.7.2), keine nennenswerten Verluste (0,007 %) auf. Größere JH-III-Mengen gingen weiterhin bei den Reinigungen nach den beiden Derivatisierungen verloren. Der Grund für diese

Verluste dürfte in der teilweisen Desorption des JH bzw. seiner Derivate von Aluminiumoxid liegen, wenn durch Waschen (besonders mit Methylenchlorid) Begleitstoffe entfernt wurden. Deshalb wurde jeder Probe vor der Aufarbeitung eine genau definierte Menge des JH-III homologen Ethylesters (JH-III-Et) als innerer Standard zugesetzt. Diese Referenzsubstanz, die sich chemisch wie JH-III verhält, ermöglichte die Ermittlung der JH-III-Verluste einer Probe. Bei der Aufarbeitung von 10 - 20 Proben war zusätzlich immer eine Referenzprobe dabei, die nur den Standard enthielt. Eine mögliche Umesterung von JH-III-Et unter den sauren Bedingungen der Methoxyderivatisierung konnte dadurch ausgeschlossen werden, daß in der Referenzprobe ausschließlich Derivate des JH-III-Et, aber nie Derivate des JH-III gefunden wurden.

3.2.3 Verhalten der JH-III-Säure während der JH-Reinigung

Wegen ihrer Epoxidgruppe, der Doppelbindungen und der zusätzlichen Säuregruppierung (im Vergleich mit JH-III) besitzt die JH-III-Säure eine geringere Lagerfähigkeit. Während einer dreimonatigen Lagerung bei -18°C wurde ca. ein Drittel der JH-III-Säure in ihr Diolderivat (s. Abb. 18) umgewandelt. Die Säure wurde deshalb für alle Versuche durch Hydrolyse von JH-III (s. Kap. 2.8.1) frisch hergestellt. Die Abtrennung vom nicht umgesetzten JH-III erfolgte durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (Isooctan, Pentan) aus dem alkalischen Hydrolysat. Erst bei einem pH von 5.0 wurde auch die JH-III-Säure von Pentan oder Chloroform extrahiert. Ihre Identität wurde durch H-NMR-Spektroskopie nachgewiesen (s. Kap. 3.3.5). JH-III-Säure ist wegen der freien Carboxylgruppe polarer als JH-III. Sie wurde bei der LiChroprep-Reinigung mit 50 % Methanol/2 % NaCl-Lösung vollständig eluiert (s. Kap. 3.3.5), während adsorbiertes JH-III erst mit 100 % Methanol entfernt wurde.

3.3 Modulation der JH-III-Biosynthese während des ersten Eireifungszyklus

3.3.1 Bestimmung des Hämolympfvolumens

Um den JH-Gehalt der Hämolymphe mit dem der Ganztiere⁹⁴ vergleichen zu können, war es notwendig, das Hämolympfvolumen von adulten Weibchen bis zum zweiten Eireifungszyklus zu bestimmen. Die Methode von Loughton und Tobe⁷⁹ bedient sich der Verteilung einer nicht metabolisierbaren, hochmolekularen Substanz in der Hämolymphe. Dafür wird üblicherweise ¹⁴C-Inulin verwandt, ein pflanzliches Reservekohlenhydrat mit einem Molekulargewicht von ca. 5000, bei dem ca. 30 d-Fruktose-Moleküle β -(1,2)glykosidisch miteinander verknüpft sind.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung des Hämolympfvolumens im Vergleich mit dem Gewicht verschieden alter Weibchen. Um einen repräsentativen Querschnitt dieser Daten zu erhalten, wurden Locusta-Weibchen aus verschiedenen Kolonien und verschiedenen Generationen getestet. Während das Gewicht der Weibchen gleich nach der Häutung konstant anstieg, nahm das Hämolympfvolumen erst nach 2 bis 3 Tagen deutlich zu. An Tag 5 erreichten sowohl das Gewicht der Tiere als auch die Hämolympfmenge ihr erstes Maximum. Nach einem Tiefpunkt beider Parameter an Tag 6 bewegten sich die gemessenen Werte bis Tag 9 auf einem Plateau, das für die Gewichtsbestimmung etwas höher lag als der zugehörige erste Peak. Einen Tag vor der Eiablage, die durchschnittlich an Tag 10 - 11 stattfand, stiegen Gewicht und Volumen der Hämolymphe wieder an und erreichten mit über 2,05 g bzw. 430 μ l ein zweites Maximum um Tag 10 (kurz vor der Eiablage). Anschließend, zum Zeitpunkt der Eiablage, sanken die gemessenen Werte wieder drastisch ab und begannen mit dem zweiten Eireifungszyklus erneut anzusteigen. Zu beachten sind die großen Streuungen des Hämolympfvolumens an Tag

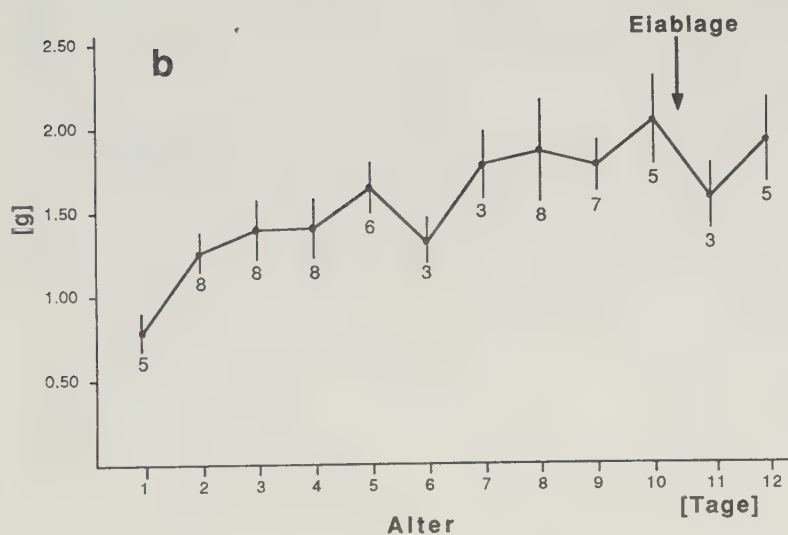
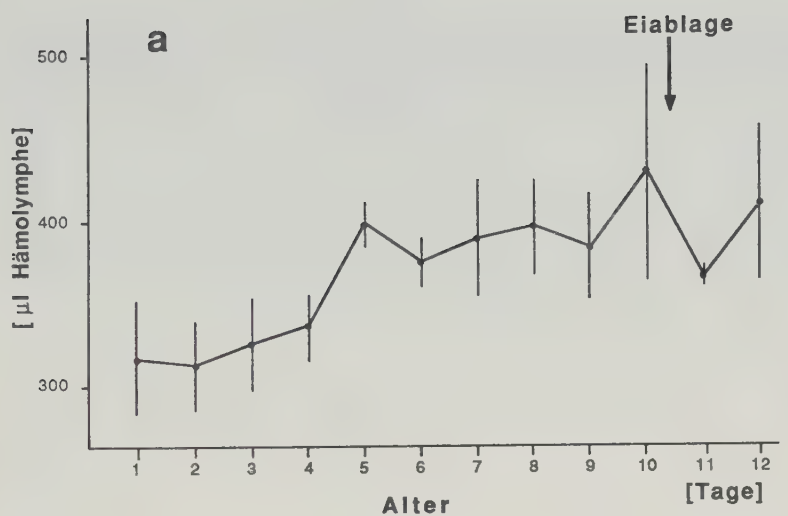


Abb. 12 Hämolympfvolumen (a) und Gewicht (b) adulter *Locusta migratoria*-Weibchen während des ersten gonadotropen Zyklus.

10 und 12, kurz vor bzw. kurz nach dem starken Einschnitt während der Oviposition. Dies läßt sich mit der asynchronen Entwicklung und der damit verbundenen Änderung der Hämolympfvolumina der Einzeltiere erklären. Die in Abbildung 12 gezeigten Werte für das Hämolympfvolumen liegen um ca. 100 µl höher als die von Loughton et al.⁷⁹ angegebenen, was wohl auf die unterschiedliche Tierhaltung (höhere Temperatur unter konstanter Beleuchtung) zurückzuführen ist.

3.3.2 JH-III-Titer in vivo und CA-Aktivität in vitro

Im Rahmen der Arbeiten über die Kontrolle des JH-Titers während der Insektenentwicklung wurde nach optimalen CA-Spendern für den Biotest (s. Kap. 3.1.2) gesucht. Eine JH-Titerkurve von adulten Locusta migratoria-Weibchen während des ersten Eireifungszyklus, gemessen mit der GC-MS-Methode, hat Rembold 1981 publiziert⁹⁴. In allen Entwicklungsstadien von Locusta migratoria (Orthoptera) wurde nur JH-III gefunden, dagegen wurden in Manduca sexta-Larven JH-I und JH-III¹⁰³ und in Galleria mellonella-Larven (beide Lepidoptera) überwiegend JH-II¹⁰⁴ gemessen. Die Empfindlichkeit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Meßmethode (GC-MS-Messung) erlaubt die Bestimmung der JH-Homologen in einer Menge von mindestens 20 pg JH pro Probe. JH-I und JH-II können demnach im Hormonpool der Wanderheuschrecke in höchstens 0,1 pmol/50 µl Hämolymphe vorhanden sein. Bis heute wurde eine Beziehung des JH-Titers in vivo zur CA-Aktivität in vitro nur bei Nauphoeta cinerea¹⁰⁵, Manduca sexta¹⁰³, Leptinotarsa decemlineata¹⁰⁶ und Diploptera punctata¹⁰⁷ untersucht. Die Bestimmungen wurden mit vereinigten Proben aus mehreren Tieren durchgeführt oder als Durchschnittswerte von Proben aus einzelnen Tieren angegeben. Mit der empfindlichen GC-MS-Messung ist es unter günstigen Umständen möglich, den JH-Gehalt in 10 µl Hämolymphe und die in vitro-Aktivität der CA gleichzeitig bei dem selben Tier zu bestimmen. In

Hämolymphe und Inkubationsmedium von Locusta migratoria wurde auch in der vorliegenden Untersuchung nur JH-III als einziges JH-Homologes nachgewiesen.

In Abbildung 13 sind die in vitro-CA-Aktivitäten während des ersten und des beginnenden zweiten Eireifungszyklus gezeigt. Die JH-Synthese in vitro stieg in der Phase der frühen Prävitellogenese und des beginnenden Oocytenwachstums stark an. Sie erreichte an Tag 7 mit maximal fast 250 pmol JH-III nach einer 6 Stunden-Inkubation ihren höchsten Wert. Am Ende der Eientwicklung fiel die CA-Aktivität in vitro drastisch ab und blieb während der Tage 8,5 bis 11 niedrig. CA aus Spendern dieses Alters gaben noch 10 - 20 pmol JH-III ins Medium ab. CA mit extrem niedrigen Syntheseaktivitäten wurden während der ganzen Entwicklungsperiode gefunden. Sichtbare Verletzungen dieser CA ließen sich aber nicht feststellen. Durchschnittlich wurden während der Prävitellogenese 50 pmol JH-III innerhalb einer 6 Stunden-Inkubation ins Medium abgegeben. Gegen Ende der Eireifung und bis hin zur Oviposition wurde die durchschnittliche Syntheseaktivität auf die Hälfte der bei der Prävitellogenese gefundenen reduziert. Zum Zeitpunkt der Oviposition zeigten die getesteten CA nur geringe Aktivitäten, die erneut mit Beginn des zweiten Eireifungszyklus anstiegen. Verglichen mit den von Couillaud et al.⁵³ veröffentlichten Daten wurde ein ähnliches Maximum der CA-Aktivitäten von Locusta migratoria während der Eireifungsphase gefunden. Es bestehen nur zeitliche Differenzen bezüglich der Entwicklungsdauer, die wahrscheinlich auf die unterschiedliche Tierhaltung zurückzuführen sind. Eine Aufzucht der Tiere unter konstanter Beleuchtung mit der dazu gehörenden Erhöhung der Temperatur auf 34 - 35 °C führte zu einer Verkürzung des gonadotropen Zyklus (im Vergleich mit den früher veröffentlichten Daten⁹⁴). Die Eiablage fand zwischen Tag 9 und 11 statt.

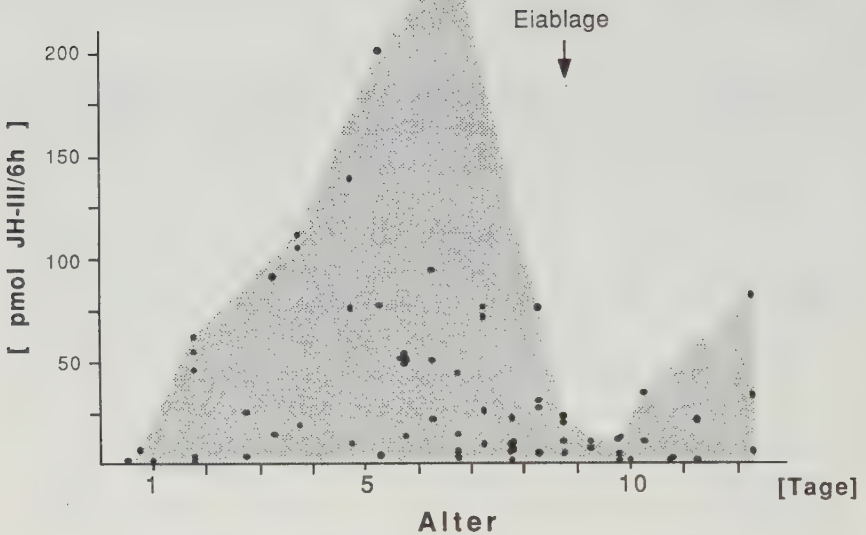


Abb. 13 In vitro CA-Aktivität während der ersten 13 Tage adulter *Locusta*-Weibchen. Für die GC-MS-Messung wurde das Inkubationsmedium eines CA-Paares verwendet.

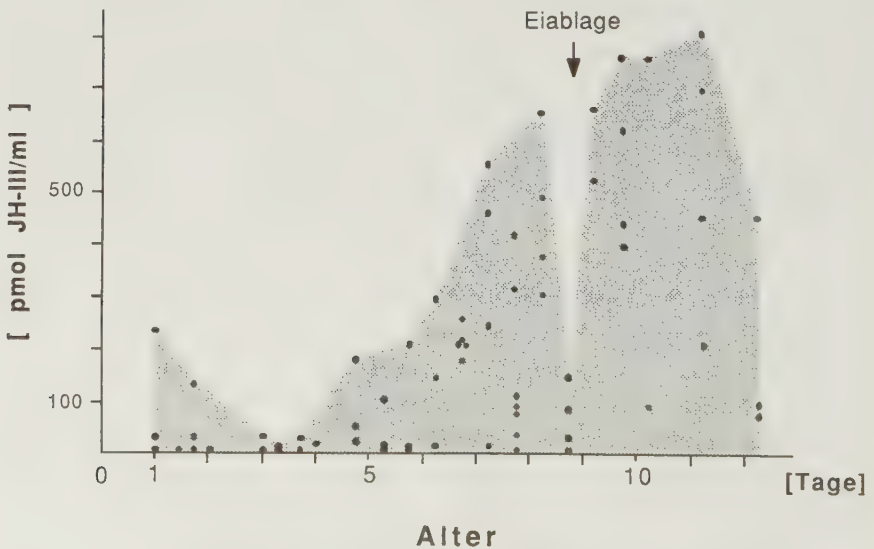


Abb. 14 JH-III-Titer in der Hämolymphe adulter *Locusta*-Weibchen während des ersten gonatotropen Zyklus (Alter in Tagen). 10 - 50 μ l Hämolymphe wurden aus Weibchen entnommen, deren CA-Aktivitäten in vitro in Abbildung 13 dargestellt sind.

In Abbildung 14 sind die JH-Werte in der Hämolymphe dargestellt, die zu den CA-Aktivitäten in Abbildung 13 gehören. Während der ersten 4 Tage war der JH-III-Gehalt der Hämolymphe sehr niedrig, was in guter Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen steht⁹⁴. Nur zwei von vierzehn Weibchen enthielten 35 pmol JH-III/ml Hämolymphe. Ab Tag 4 mit dem beginnenden Oocytenwachstum stieg der JH-Titer auf 650 pmol JH-III/ml Hämolymphe. Der erste Eireifungszyklus endete mit der Oviposition bei den meisten getesteten Weibchen um Tag 9. Zu diesem Zeitpunkt konnten bestenfalls noch 150 pmol JH-III/ml Hämolymphe gemessen werden. Mit dem Beginn des zweiten Eireifungszyklus (ab Tag 10) stieg die JH-Menge in der Hämolymphe auf 800 pmol JH-III/ml Hämolymphe an.

Das Maximum der CA-Syntheseleistung *in vitro* wurde einen Tag vor dem höchsten JH-Wert in der Hämolymphe, nämlich an Tag 8,5 erreicht. Zum Zeitpunkt der Eiablage waren JH-Titer und CA-Aktivität gering. Am Anfang des zweiten Eireifungszyklus wurden in der Hämolymphe hohe JH-Titer gemessen, während die JH-Biosynthese nur langsam zunahm.

Der Quotient f aus JH-III/ml Hämolymphe und JH-Biosynthese wurde für jedes Einzeltier ermittelt und in Abhängigkeit vom Alter in Abbildung 15 dargestellt. Tiere, deren CA keine nachweisbaren Mengen JH-III synthetisierten, wurden nicht berücksichtigt. Bis Tag 6 stieg die Syntheseaktivität der CA bei den meisten Tieren an, während in der Hämolymphe nur eine geringe JH-Konzentration gemessen wurde. In der zweiten Hälfte des Eireifungszyklus lag der Quotient f zwischen 5 und 80, das heißt der JH-Gehalt stieg bei abnehmender CA-Aktivität an. Die Beziehung zwischen CA-Aktivität und JH-Titer war demnach stark vom Alter der Tiere abhängig.

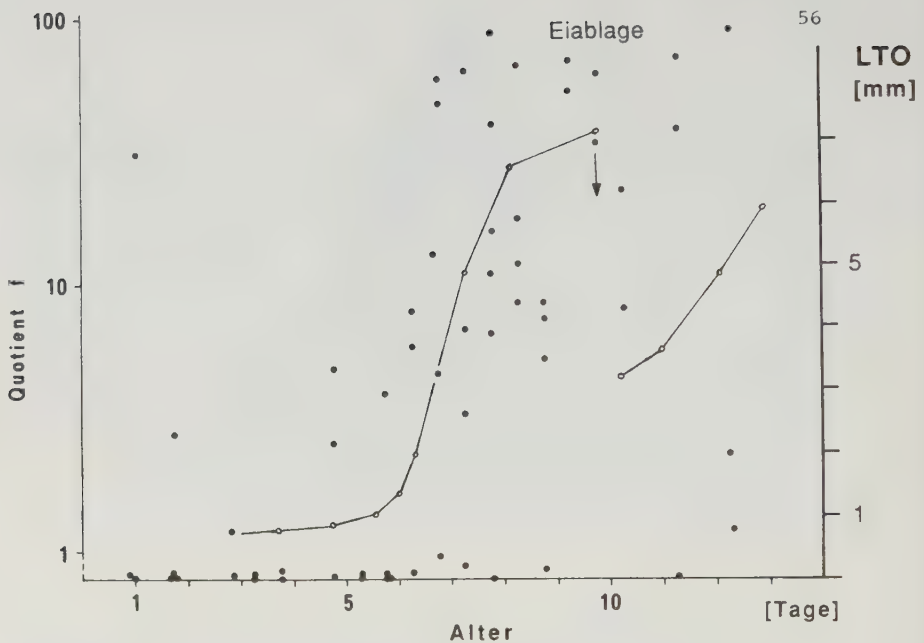


Abb. 15 Quotient f aus Hämolympth-JH-Titer (in pmol JH-III/ml HL) und CA-Aktivität (in pmol JH-III nach 6 Stunden Inkubation) in Abhängigkeit vom Alter der Testtiere. Beide Werte stammen aus dem gleichen Tier und sind mit GC-MS ermittelt worden (Einzelwerte in Abb. 13 und Abb. 14). Zum Vergleich ist die mittlere LTO in mm angegeben (o).

3.3.3 Schwankungen der CA-Aktivitäten während eines Kalenderjahres

Die spontane JH-Biosynthese *in vitro* wurde im Verlauf eines Kalenderjahres beobachtet. In Abbildung 16 sind die CA-Aktivitäten während 4 Stunden Inkubationszeit (nach einer Präinkubation von 2 Stunden) dargestellt. Die CA-Spendertiere waren Weibchen im Alter von 2,5 Tagen (nach der Adulthäutung). Obwohl die Tiere in unseren Breitengraden immer unter gleichen Zuchtbedingungen aufwuchsen, lebten und sich fortpflanzten, wurden sehr unterschiedliche, von der Jahreszeit abhängige CA-Syntheseleistungen gemessen. Die höchsten JH-Biosyntheseraten junger Weibchen wurden in den Monaten Februar bis Mai und Juli erreicht, wobei im April (Frühling) Höchstwerte von durchschnittlich 45,8 pmol

JH-III/CA-Paar x 4 h ermittelt wurden. Im Herbst und Winter (bis einschließlich Januar) zeigten die CA geringe Biosyntheseaktivitäten, dabei wurde im November mit durchschnittlich $8,9 \pm 4,7$ pmol JH-III/CA-Paar x 4 h ein Minimum durchlaufen. Die unterschiedlichen CA-Aktivitäten der einzelnen Tests wurden möglicherweise durch derartige jahreszeitlich bedingte Einflüsse verursacht. Unabhängig von der Grundaktivität wurde die CA-Syntheserate durch die Zugabe von Allatotropin in vitro mindestens um den Faktor 2,5 erhöht.

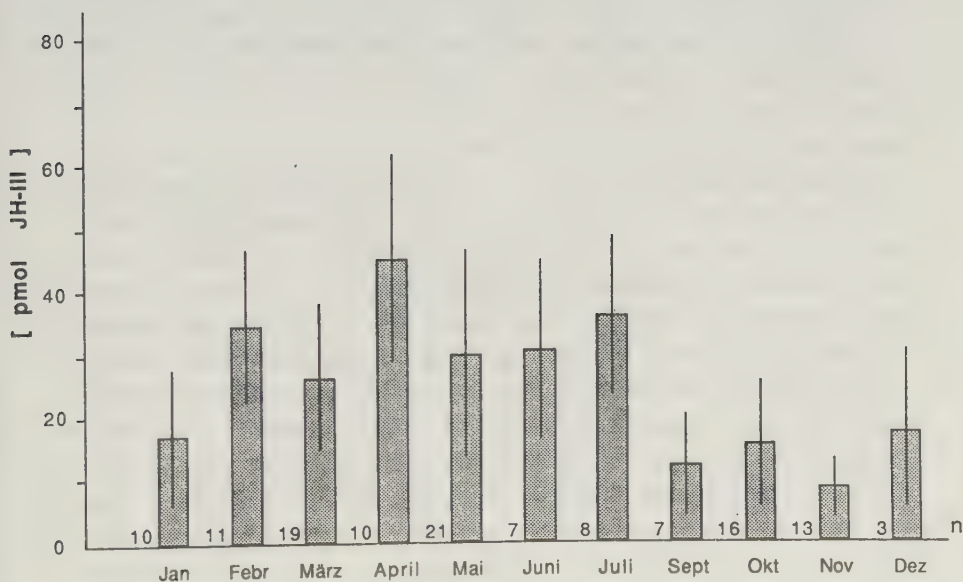


Abb. 16 CA-Aktivitäten in vitro von adulten Weibchen (Alter 2,5 Tage) während eines Kalenderjahres. Gezeigt ist die mittlere JH-III-Synthese in pmol, die während 4 Stunden Inkubationszeit gemessen wurde (nach 2 Stunden Präinkubation, n = Anzahl der CA-Paare).

3.3.4 Untersuchung der JH-III-Poolgröße der Corpora allata

Pratt und Tobe⁷⁰ berichten, daß die CA in vitro kein radioaktives JH-III speichern. Sie fanden, daß ^{14}C -Methionin nach 30 Minuten in JH-III eingebaut und in das Kulturmedium freigesetzt worden war. Die molare Inkorporationsrate des ^{14}C -Methionins betrug nach dieser Zeit 0,8. Während der restlichen Inkubationszeit (insgesamt 3 Stunden) war die JH-Abgabe proportional der JH-Syntheserate. Die oben genannten Autoren setzen deshalb die JH-Abgabe mit der JH-Synthese in vitro gleich. Der JH-Gehalt in vivo wurde bei den CA während des ersten und beginnenden zweiten Eireifungszyklus mit Hilfe der GC-MS-Methode bestimmt. Da sehr wenig JH-III zu erwarten war, wurden die CA-Paare von 4 oder 8 Locusta-Weibchen gesammelt und gemeinsam aufgearbeitet. In Abbildung 17 sind die JH-III-Werte pro CA-Paar nach der Länge der terminalen Oocyten (LTO) geordnet. Während der Prävitellogenese und des beginnenden Eiwachstums wurde kein JH-III in den Organen gefunden. Dagegen synthetisierten diese Drüsen in vitro bis zu 200 pmol JH-III (s. Kap. 3.3.2, Abb. 13). In den CA von Weibchen mit LTO 3,2 mm wurden 0,1 pmol JH-III/Drüsenpaar bestimmt, während bei LTO 4,0 mm kein JH-III in den CA gefunden wurde. In der letzten Phase des Oocytenwachstums (LTO 5,5 - 6,0 mm) wurden um 1 pmol JH-III/CA-Paar gemessen. Kurz vor der Eiablage sank der JH-Gehalt der Drüsen auf noch meßbare Werte von weniger als 0,1 pmol JH-III ab; dies korrelierte mit einem drastischen Absinken sowohl der CA-Aktivität als auch des Hämolympth-JH-Titers (vgl. Abb. 13 und 14). Zu Beginn des zweiten Eireifungszyklus enthielten die Organe durchschnittlich ca. 1 pmol JH-III und gegen Ende der Eientwicklung des zweiten donadotropen Zyklus wurden sogar 6,3 pmol JH-III/CA-Paar gemessen. Dies deutet auf eine Hemmung der JH-Abgabe der CA mit zunehmenden Alter der Tiere hin.

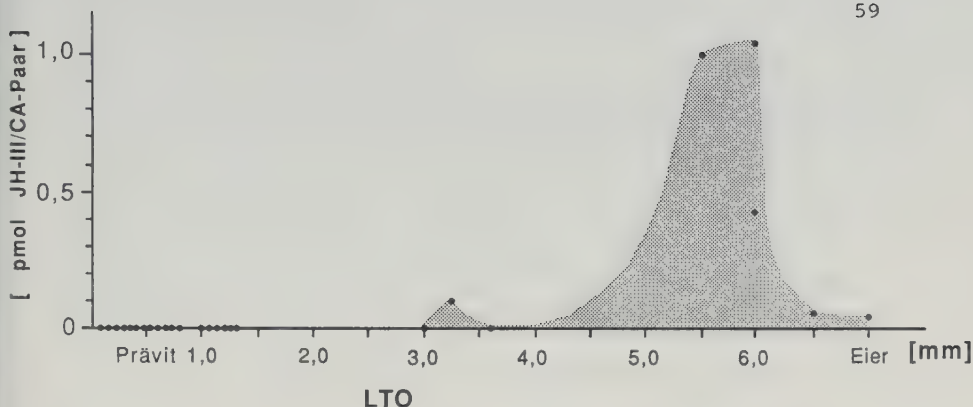


Abb. 17 JH-III in den CA adulter *Locusta*-Weibchen während des ersten Eireifungszyklus in Abhängigkeit von der LTO (mm). Es wurden jeweils 4 - 8 CA-Paare zusammen aufgearbeitet und mit der GC-MS-Methode gemessen. Angegeben sind die Werte pro CA-Paar in pmol JH-III (Prävit = Prävitellogenese)

3.3.5 Bestimmung der JH-III-Säure

JH-III-Säure (10,11-Epoxifarnesensäure, s. Abb. 18), die aus JH-III durch alkalische Hydrolyse und anschließende Chloroform-Extraktion des angesäuerten und getrockneten Reaktionsgemisches gewonnen worden war (s. Kap. 2.8.1), wurde durch H-NMR-Spektroskopie identifiziert. Signale im H-NMR-Spektrum (CDCl_3 , TMS): δ 1,26 ppm (3H-12, s), 1,30 (3H-13, s), 1,4 - 2,2 (8H-4,5,8,9, m), 2,14 (3H-14 und 3H-15, s), 2,70 (H-10, t), 5,14 (H-6, s_{br}), 5,69 (H-2, s_{br}), 6,03 ($-\text{CO}_2\text{H}$, s_{br}). Das azide Proton der Säure ließ sich mit D_2O austauschen.

Für die Bestimmung der JH-III-Säure war es nötig, die bei der Aufarbeitung zugegebenen Salze zu entfernen. Dazu wurde die Säure an LiChroprep RP8 (0,5 g) adsorbiert und die Salze mit 10 % wässrigem Methanol ausgewaschen, da JH-III-Säure sowohl mit 50 %- als auch mit 25 %igem Methanol desorbiert wurde. Mit der in Kapitel 2.8.2 beschriebenen Reinigung und Derivatisierung der JH-III-Säure wurden einige CA-Homogenate auf ihren Säuregehalt untersucht. CA aus 2,5 - 7,5 Tage

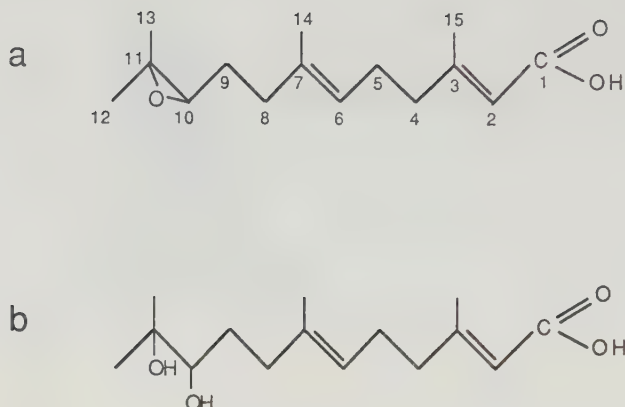


Abb. 18 Formelbilder von JH-III-Säure (a) und deren Diol-derivat (b)

alten Weibchen enthielten keine JH-III-Säure. An Tag 2 (larvales Ovar) und an Tag 8 (Phase des sehr raschen Oocytenwachstums) wurden 2,6 pmol bzw. 0,4 pmol JH-III-Säure/CA-Paar bestimmt. JH-Säure wurde von Sparagana et al.¹⁰⁸ indirekt über eine Bestimmung der Methoxymethyltransferase-Aktivität in den Imaginalscheiben im letzten Larvenstadium von Manduca sexta nachgewiesen.

3.4 Hemmung der Corpora allata in vitro

3.4.1 Desaktivierung durch CC-Organ

Durch Zugabe von je einem CC-Organ nach 45, 90 und 135 Minuten zum Inkubationsmedium wurde sogar eine Abnahme der CA-Aktivität gegenüber der Syntheseleistung der Kontrollen gemessen (Alter der Spenderinnen ca. 14 Tage). In Abbil-

dung 19 ist der Verlauf der JH-III-Abgabe in vitro einiger CA-Paare während einer 3 Stunden-Inkubation a) im Boehringer-MEM-Medium und b) im Medium 199 nach Zugabe von CC-Organen dargestellt. In weiteren Biotests betrug die JH-III-Synthese der mit CC behandelten CA zwischen 45 und 180 Minuten $9,3 \pm 4,8$ pmol JH-III/CA-Paar ($n = 7$), die JH-Zunahme bei den Kontroll-CA $20,1 \pm 11,4$ pmol JH-III/CA-Paar ($n = 14$).

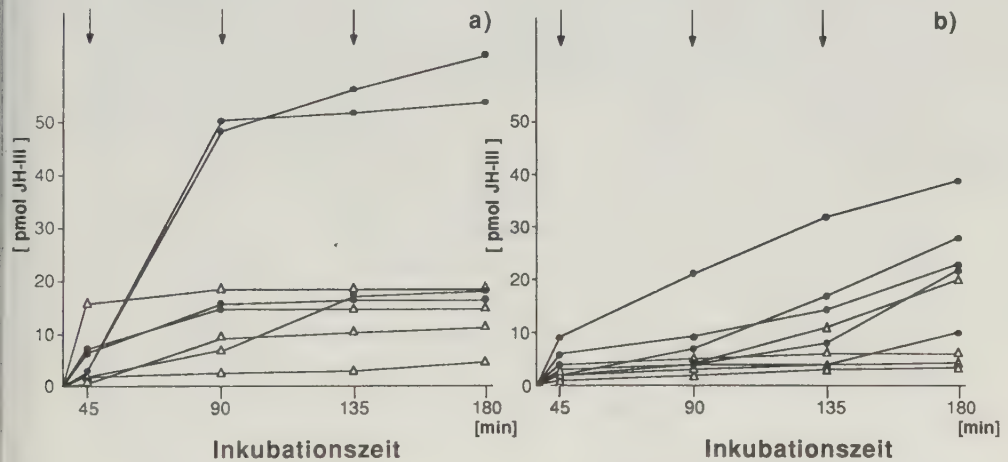


Abb. 19 JH-III-Synthese in vitro während 3 Stunden in Boehringer-MEM-Medium (a) und im Medium 199 (b). Die Pfeile markieren die Zugabe von jeweils einem CC-Organ. CA mit CC (Δ); Kontroll-CA ($\bullet$).

Eine ähnliche Abnahme der CA-Aktivität wurde unter den gleichen Inkubationsbedingungen nach Zugabe eines entfetteten methanolischen Extraktes von je zwei CC nach 45, 90 und 135 Minuten beobachtet. Während die Kontroll-CA nach der Präinkubationszeit (45 min) $7,7 \pm 3,8$ pmol JH-III/CA-Paar ($n = 3$) ins Medium abgaben, produzierten CA, die mit CC

inkubiert wurden, nur $4,5 \pm 2,1$ pmol JH-III/CA-Paar ($n = 10$). Durchschnittlich hatten die Kontroll-CA nach Ablauf der 3 Stunden-Inkubation die 2 - 3fache JH-III-Menge der behandelten CA-Paare synthetisiert.

3.4.2 Hemmung der JH-Biosynthese durch Sephadex-Fractionen

Eine im vorhergehenden Kapitel beschriebene Desaktivierung der CA-Syntheseleistung wurde auch durch einzelne Fraktionen der Extrakte, die durch Chromatographie an Sephadex LH20 gereinigt waren, unter veränderten Inkubationsbedingungen festgestellt. In einem 9 Stunden-Test wurden die CA (von 10 - 14 Tage alten Locusta-Weibchen) nach jeweils 1, 3 und 6 Stunden mit Fraktionen von CC- oder Gehirnmateriel aktiviert. Abbildung 20 zeigt das Chromatogramm des Extrakts von 80 Gehirnen an Sephadex LH20 mit den Ergebnissen des zugehörigen biologischen Tests mit den Fraktionen G-1 und G-2. Die mit G-1 behandelten CA synthetisierten zwischen 3 und 9 Stunden nur noch die Hälfte der JH-III-Menge der Kontroll-CA, während G-2 die JH-Synthese stimulierte.

Auch die Fraktion C-2 nach Sephadex LH20-Chromatographie (Extrakt aus 80 CC) inhibierte die CA-Aktivität. In Tabelle 7 sind die Testergebnisse bei Verwendung eines Inkubationsmediums mit und ohne Farnesol angegeben. In beiden Medien reduzierte die Fraktion C-2 die JH-III-Synthese deutlich. Umgekehrt zeigte die entsprechende Fraktion C-1 (Tab. 7) im in vitro-Test ATH-Aktivität durch eine höhere JH-Biosynthese der stimulierten CA im Vergleich zu den Kontroll-CA.

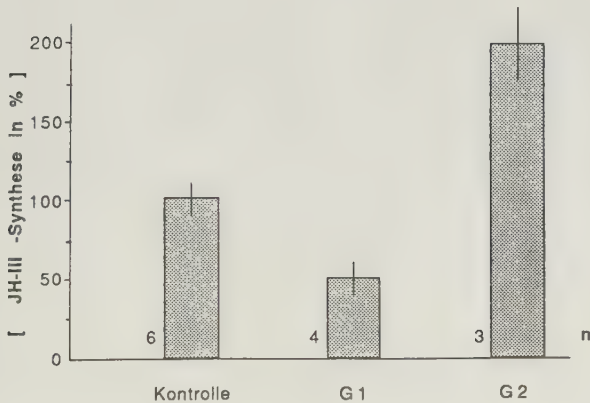
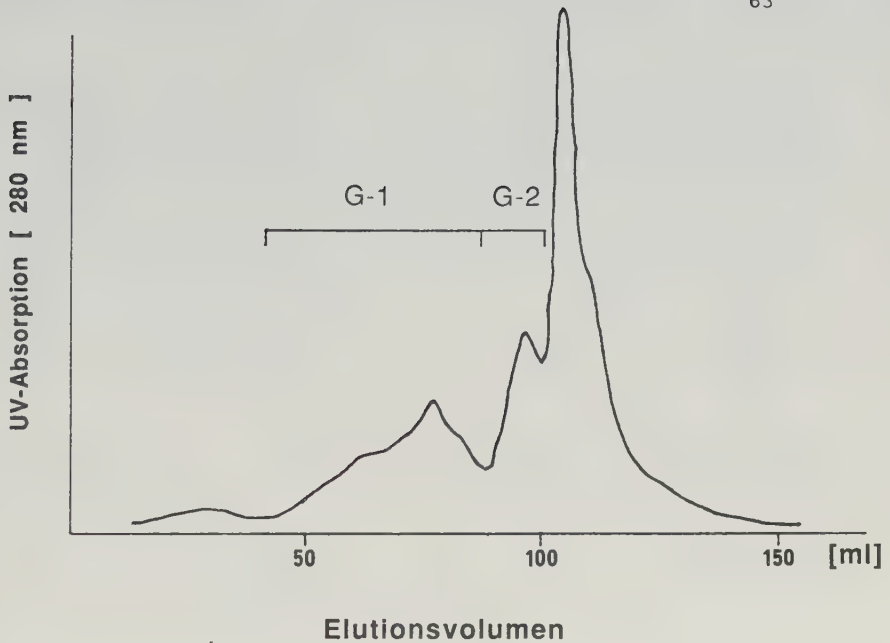


Abb. 20 UV-Absorptionskurve (280 nm) eines an Sephadex LH20 chromatographierten entfetteten Extrakts aus 80 *Locusta*-Gehirnen (oben) und die Wirkung der einzelnen Fraktionen (G-1 und G-2, je 6 CC-Äquivalente) auf die JH-Biosynthese in vitro (unten). Angegeben sind die mittleren Biosyntheseraten der CA in % im Vergleich mit den Kontrollen (deren JH-III-Syntheserate ist 100 % gesetzt).

Tabelle 7 Desaktivierende Wirkung der Fraktion C-2 nach Sephadex LH20-Chromatographie in vitro. Inkubiert wurde mit jeweils 4,4 CC-Äquivalenten/CA-Paar nach 1, 3 und 6 Stunden bei einer Gesamtinkubationszeit von 9 Stunden. Die mittlere JH-Biosyntheserate zwischen 3 und 9 Stunden von n CA-Paaren wurde gemessen. Da die Grundaktivitäten der Kontrollen in den beiden Tests für die Fraktionen C-1 und C-2 unterschiedlich waren, ist die JH-Syntheserate in % angegeben.

Medium 199	n	Kontrolle	n	C-1	n	C-2
m. Farnesol	7	100 $\pm$ 30,4	3	163,2 $\pm$ 22	4	52,1 $\pm$ 7
o. Farnesol	7	100 $\pm$ 32,5	3	216,9 $\pm$ 24	4	29,0 $\pm$ 14

Fraktion C-1 aus der Chromatographie von CC-Extrakt an Sephadex G15 verminderte ebenfalls die CA-Aktivität (Tab. 8). Die JH-III-Biosynthese in vitro von Weibchen, die einen Tag alt waren, wurde durch Zugabe von C-1 um mehr als die Hälfte, die Syntheserate der CA aus 3 Tage alten Weibchen um ein Drittel der Kontroll-CA reduziert. Die dazugehörige Fraktion C-2 stimulierte aber nur die CA, deren Spenderinnen drei Tage alt waren. CA aus sehr jungen Weibchen (Tag 1) synthetisierten nahezu die gleiche JH-Menge wie die korrespondierenden Kontroll-CA (vgl. Tab. 5).

Alle drei Fälle von desaktivierender Wirkung einer Fraktion nach Gelchromatographie konnten mit gleichem Ausgangsmaterial und gleicher Trennmethode nicht reproduziert werden.

Tabelle 8 Desaktivierung von CA junger Locusta-Weibchen in vitro mit an Sephadex G15 fraktioniertem Extrakt aus 4 CC. Angegeben ist die mittlere JH-Synthese in pmol JH-III/CA-Paar während 4 Stunden Inkubationszeit (nach 2 Stunden Präinkubation, vgl. Tab. 5).

Alter	n	Kontrolle	n	Fraktion C-1
Tag 1	6	34,9 $\pm$ 9,8	3	15,1 $\pm$ 3,6
Tag 3	4	34,5 $\pm$ 5,4	3	23,4 $\pm$ 11,8

3.5 Aktivierung der CA in vitro mit Allatotropin

3.5.1 Aktivierung mit CC-Organen

Nach den bisher vorliegenden Befunden^{50,60,89,109,110} wird Allatotropin im Gehirn synthetisiert, im Nerv (NCC I) zu den Corpora cardiaca transportiert⁶⁰ und dort gespeichert. Erste Aktivierungsversuche in vitro wurden durch Zugabe ganzer Corpora cardiaca (glandulärer und speichernder Teil) in das Inkubationsmedium unternommen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen^{109,110} ergab ein 3 Stunden-Test keine eindeutigen Ergebnisse (s. Kap. 3.1.3.1). Die in Abbildung 9 (s. Kap. 3.1.3.4) dargestellten Werte zeigen den Verlauf der JH-Abgabe in das Medium. Nach 3 Stunden überschritt nur eines von acht CA-Paaren eine Syntheseleistung von 10 pmol JH-III. Zu diesem Zeitpunkt wurden die CA (im Vergleich mit den Kontrollen) weder stimuliert noch inhibiert. Eine Erhöhung der Syntheserate erfolgte erst nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 23 - 24 Stunden. Die hohe Spontanaktivität eines Kontroll-CA-Paares (Abb. 9) innerhalb der ersten drei Stunden ging anschließend deutlich zurück. Zwischen

3 und 24 Stunden gaben die Kontroll-CA durchschnittlich $14,8 \pm 5,9$ pmol JH-III in das Medium ab, während die stimulierten CA in diesem Zeitraum $57,7 \pm 7,8$ pmol JH-III synthetisierten. Bei der Langzeitinkubation sank der pH-Wert in der Hälfte aller Proben ab, was durch den Farbumschlag des Indikators Phenolrot nach Gelb sichtbar war.

3.5.2 Fraktionierung von CC-Extrakt durch Gelchromatographie

Gehirne und CC von adulten geschlechtsreifen Wanderheuschrecken dienten als Ausgangsmaterial für die Anreicherung des allatotropen Faktors. Die Organe wurden, wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben, homogenisiert, entfettet und mit 80 % Methanol in Wasser extrahiert. Anschließend folgte eine Gelchromatographie des Extrakts über Sephadex verschiedener Porengrößen, wobei immer 80 % wässriges Methanol als Eluens verwendet wurde. Diese Chromatographien werden im folgenden beschrieben.

Abbildung 21 zeigt die UV-Absorptionskurve (280 nm) von CC-Extrakt bei der Chromatographie an Sephadex G10 (Fraktionen C-1 bis C-3). Im CA-Test wurde ein Aliquot dieser Fraktionen auf biologische Aktivität überprüft (Tab. 9). Die ATH-Aktivität war im Frontpeak (Fraktion C-1) enthalten. Sie verdoppelte die JH-III-Biosynthese.

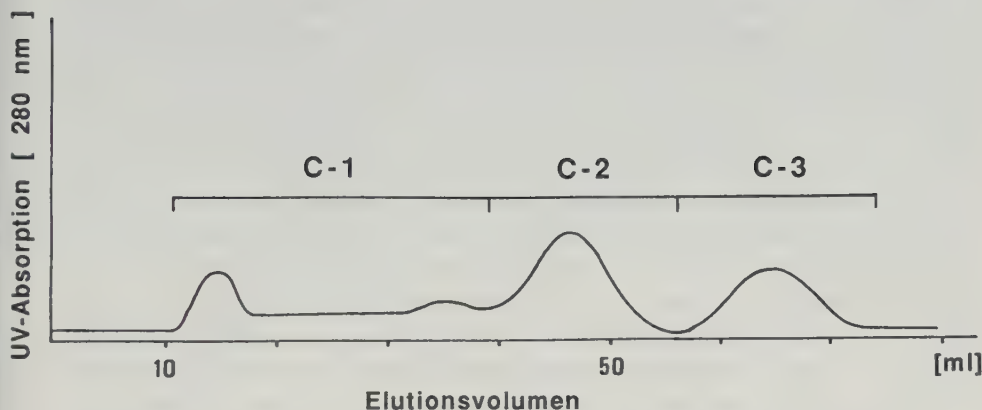


Abb. 21 Chromatogramm eines CC-Extrakts (80 CC) an Sephadex G10 (UV-Absorption bei 280 nm). Das Eluat wurde in den Fraktionen C-1 bis C-3 gesammelt.

Tabelle 9 JH-III-Biosynthese in vitro nach Zusatz von Sephadex G10-Fractionen. Aktiviert wurde mit 2 CC-Äquivalenten/CA-Paar nach 2 Stunden Präinkubation.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
Kontrolle	5	21,7 ± 5,5	100 ± 25,4
Fraktion C-1	4	45,1 ± 13,9	207,8 ± 64,1
Fraktion C-2	4	26,6 ± 8,8	122,6 ± 40,4
Fraktion C-3	4	21,0 ± 8,6	96,8 ± 39,7

Die Abbildung 22 zeigt typische Chromatogramme über Sephadex LH20 von Extrakten (a) aus 80 Gehirnen und (b) aus 80 CC. Das Eluat wurde jeweils in drei Fraktionen aufgefangen (G-1 bis G-3, C-1 bis C-3) und im in vitro-Test auf ATH-Aktivität untersucht (Inkubationsdauer 9 Stunden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Nach 1, 3 und 6 Stunden wurden Extrakte von jeweils 6,6 Gehirnäquivalenten bzw. 5 - 8 CC-Äquivalenten dem Medium zugegeben.

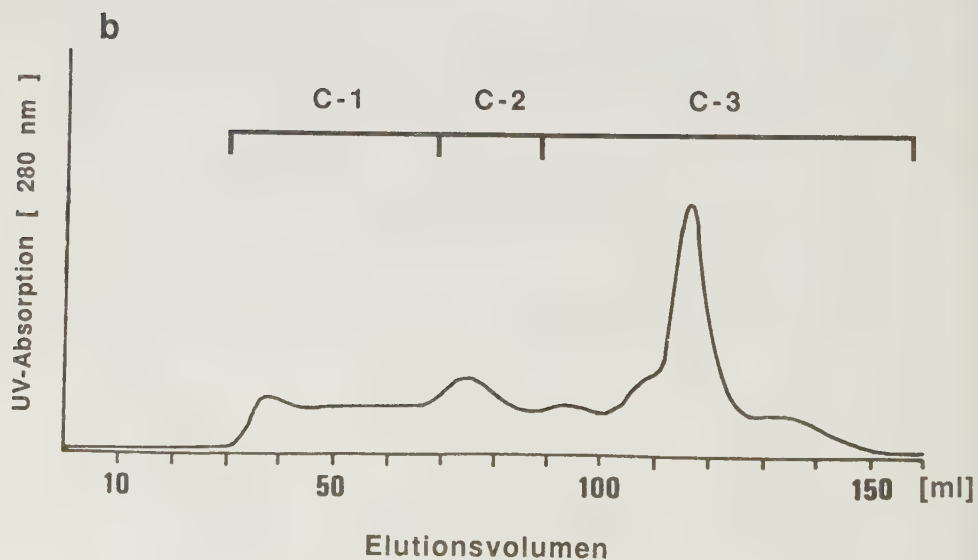
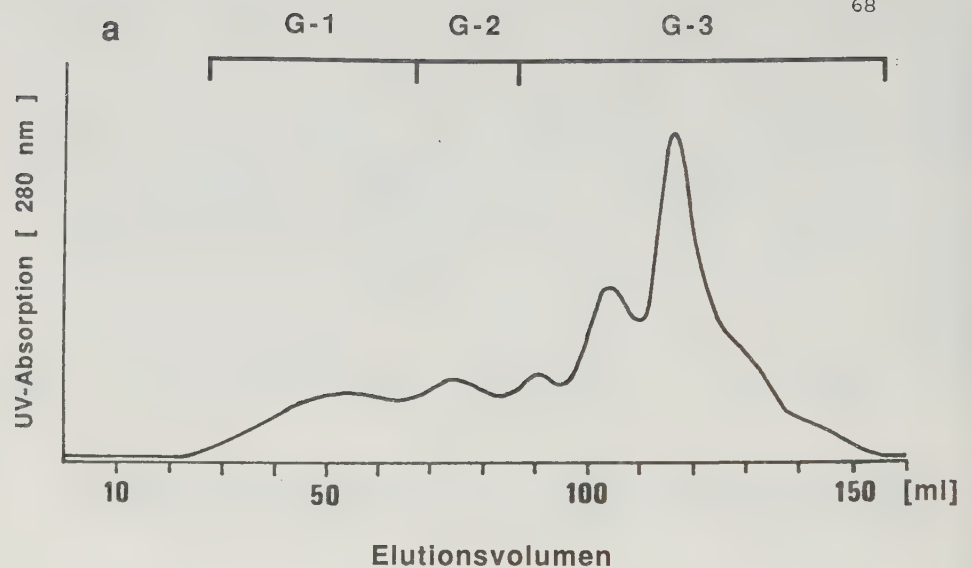


Abb. 22 Typisches Chromatogramm eines Extrakts aus 80 Gehirnen (a) und aus 80 CC (b) über Sephadex LH20 bei 280 nm

Alle Fraktionen wurden gleichzeitig in Medium mit und ohne Farnesolzusatz getestet. Fraktion C-2 verdoppelte die in vitro-Aktivität der CA in Medium ohne Farnesol, C-1 und C-3 dagegen hatten keinen Einfluß auf die spontane JH-Biosynthese. In Gegenwart von Farnesol erhöhte die Fraktion C-2 die CA-Syntheseleistung auf das 2,5fache der Kontrollen (Tab. 10). Auch die Fraktion C-1 zeigte unter diesen Bedingungen (Farnesol) eine geringe ATH-Aktivität, während Fraktion C-3 nicht aktivierte. Das Verhältnis von aktivierter zu spontaner JH-Biosynthese blieb nach 6 Stunden gleich. Die teilweise hohe Streuung der Werte im in vitro-Test ist mit der hohen Spontanaktivität einzelner CA-Paare, deren Syntheseleistungen weit über dem Mittelwert liegen, zu erklären. Gehirnextrakt bewirkte unabhängig vom Farnesolzusatz unter den beschriebenen Testbedingungen eine maximal zweifache Steigerung der JH-III-Biosyntheserate in vitro (Tab. 10).

Tabelle 10 Syntheseleistung von CA in vitro in pmol JH-III zwischen 3 und 9 Stunden nach Zugabe von Sephadex LH20-Frak-tionen. Zum Vergleich ist die JH-Biosynthese während dieser Zeit in % der Spontanaktivität angegeben (Frakt. = Fraktion)

	Medium ohne Farnesol			Medium mit Farnesol		
	n	pmol JH-III /CA-Paar x 6h	in %	n	pmol JH-III /CA-Paar x 6h	in %
Kontrolle	7	16,4 $\pm$ 13,7	100	4	41,1 $\pm$ 13,4	100
Frakt. G-1	4	24,1 $\pm$ 12,3	147	3	45,7 $\pm$ 11,4	111
Frakt. G-2	3	32,6 $\pm$ 18,2	199	3	72,9 $\pm$ 16,4	177
Kontrolle	17	18,2 $\pm$ 9,3	100	21	42,1 $\pm$ 20,2	100
Frakt. C-1	14	16,4 $\pm$ 6,7	90	11	66,1 $\pm$ 17,9	157
Frakt. C-2	11	38,2 $\pm$ 17,4	210	12	98,7 $\pm$ 32,2	234
Frakt. C-3	4	12,5 $\pm$ 7,7	69	6	37,2 $\pm$ 9,1	88

Bei dem Versuch, die ATH-Aktivität in einem engeren Bereich der Sephadex LH20-Chromatographie - in Fraktion C-2 - zu eluieren, wurde das Allatotropin in Fraktion C-1 gefunden (Tab. 11). Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Chromatographien besaß Fraktion C-2 nur eine geringe allatotrope Wirkung auf die CA in vitro (im Vergleich zu den Kontroll-CA).

Tabelle 11 Fraktionen nach Chromatographie eines Extrakts aus CC von Locusta migratoria an Sephadex LH20 mit gegenüber Tabelle 10 veränderter Elution. Angegeben ist die JH-III-Synthese während 6 Stunden (Gesamtinkubationszeit 9 Stunden)

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 6 h	Zuwachs in %
Kontrolle	4	27,8 $\pm$ 7,1	100 $\pm$ 25,5
Fraktion C-1	4	75,7 $\pm$ 17,6	272,3 $\pm$ 63,3
Fraktion C-2	3	28,2 $\pm$ 8,2	101,4 $\pm$ 29,5

Der Grund für das unterschiedliche Säulenverhalten ist nicht bekannt. Denkbar sind differierende Proteinmuster, die von einem anderen physiologischen Zustand der Tiere kommen dürften. Nach diesem Versuch war anzunehmen, daß die ATH-Aktivität am Ende bzw. am Anfang der willkürlich geschnittenen Fraktionen C-1 und C-2 liegen mußte. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, daß ATH hauptsächlich in den CC enthalten ist, diese also die Sammelorgane für das Allatotropin darstellen dürften.

Anreicherung durch Chromatographie an Sephadex G15

Für die chromatographische Trennung von Proteinen bzw. Peptiden werden je nach Molekülgröße Gele verschiedener Porengröße eingesetzt. Das Elutionsverhalten von Substanzen ist temperaturabhängig. Nachdem das Allatotropin an Sephadex G10 mit der Front, an Sephadex LH20 überwiegend mit dem zweiten Peak, aber auch in Fraktion C-1 (siehe oben) eluiert wurde, bot sich eine Chromatographie an Sephadex G15 an. Drei Fraktionen wurden mit 80 % wässrigem Methanol als Eluens gesammelt. Die Elutionsvolumina waren für Fraktion C-1 68 ml und für Fraktion C-2 90 ml bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml/h. Die biologische Aktivität wurde mit CA aus 2,5 - 3 Tage alten Locusta-Weibchen getestet. Die Inkubationszeit wurde auf 6 Stunden reduziert, wobei nach 2 Stunden ein Extrakt von 2 CC pro CA-Paar dem Medium zugegeben wurde. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde die ATH-Aktivität reproduzierbar in Fraktion C-2 gefunden. Beispiele sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Die Stimulierung durch Fraktion C-2 betrug das 2,5fache der in vitro-Syntheseleistung der Kontroll-CA. Durch Fraktion C-1 wurden die CA in vitro leicht aktiviert; Fraktion C-3 war im biologischen Test inaktiv, wie auch die getesteten dritten Fraktionen der Chromatogramme von Sephadex G10 und LH20 (s. Tab. 9 und 10). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Porengrößen (G10, G15 und LH20) wurden mit Fraktion C-3 möglicherweise niedermolekulare Peptide, Aminosäuren und Salze eluiert. Damit dürfte auch die geringere JH-III-Biosynthese der mit Fraktion C-3 behandelten CA gegenüber der Spontanaktivität (Kontrolle) zu erklären sein. Wegen der Reproduzierbarkeit schien die Chromatographie an Sephadex G15 für eine Reinigung des ATH besser geeignet zu sein, als eine solche an Sephadex LH20.

Tabelle 12 Wirkung von über Sephadex G15 fraktioniertem CC-Extrakt auf die JH-III-Biosynthese in vitro. Den CA wurden nach 2 Stunden Präinkubation 2 CC-Äquivalente zugesetzt und die JH-Synthese während weiterer 4 Stunden gemessen.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
Kontrolle	12	25,2 $\pm$ 5,6	100 $\pm$ 22,2
Fraktion C-1	15	42,2 $\pm$ 23,7	167,5 $\pm$ 94,1
Fraktion C-2	12	61,0 $\pm$ 18,7	242,1 $\pm$ 74,2
Fraktion C-3	6	27,9 $\pm$ 8,7	110,7 $\pm$ 34,4

3.5.3 Weitere Reinigung der Fraktion C-2 über LiChrorep RP8

Für die weitere Anreicherung des Allatotropins wurden die heute allgemein üblichen chromatographischen Verfahren für Peptide angewandt. Reversed-phase-Material von unterschiedlicher C-Kettenlänge (RP8 - RP18) hat sich für diese Trennprobleme als besonders leistungsfähig erwiesen und durchgesetzt. Eluiert wird dabei mit polaren Lösungsmitteln, wie Wasser, Methanol oder Acetonitril, deren Elutionsstärken mit einem Pufferzusatz eingestellt werden.

Fraktion C-2 der Sephadex G15-Chromatographie und entfettetes, methanollösliches biologisches Material wurde deshalb durch Adsorption und Desorption an LiChrorep RP8 weiter gereinigt. Bei schrittweiser Elution mit Wasser, Acetonitril/Wasser und reinem Acetonitril wurde die an RP-Material adsorbierte ATH-Aktivität mit 30 % Acetonitril/Wasser desorbiert. Biologisches Material, das mit 30 % Acetonitril eluiert wurde, erhöhte die JH-Synthese der CA im Vergleich mit den Kontrollen um den Faktor 3 (Tab. 13). Eine

leichte Steigerung der JH-III-Synthese auf das 1,5fache der Spontanaktivität wurde auch durch die Fraktion erreicht, die mit reinem Acetonitril eluiert wurde. Das Wasser- und das 20 % Acetonitril/Wasser-Eluat beeinflussten kaum die spontane CA-Syntheserate.

Tabelle 13 JH-III-Biosynthese nach Behandlung von Locusta-CA in vitro mit CC-Fraktionen nach Sephadex G15-Chromatographie und anschließender LiChroprep RP8-Reinigung. Die Aktivierung erfolgte durch Zusatz von 2 CC-Äquivalenten/CA-Paar.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
Kontrolle	7	22,8 $\pm$ 5,2	100 $\pm$ 22,8
C-2 nach Sephadex G15	4	51,5 $\pm$ 23,2	225,9 $\pm$ 101,8
C-2 nach LiChroprep RP8-Reinigung			
Elution m. Wasser	4	28,9 $\pm$ 9,5	126,8 $\pm$ 41,6
m. 20 % Acetonitril	4	33,4 $\pm$ 9,4	146,5 $\pm$ 41,2
m. 30 % Acetonitril	3	68,5 $\pm$ 26,0	300,4 $\pm$ 114,0
m. 100% Acetonitril	4	36,3 $\pm$ 5,1	159,2 $\pm$ 22,4

Nach diesen Ergebnissen besaß ATH nach zusätzlicher LiChroprep RP8-Reinigung eine größere Wirkung auf die JH-Biosynthese als nach Sephadex G15-Reinigung. Ein Extrakt aus zwei CC verdoppelte nach Sephadex-Reinigung die in vitro Aktivität; nach seiner weiteren Reinigung wurde eine dreifache Aktivierung erreicht (Tab. 13).

Um alles biologisch aktive Material (besonders durch Sephadex nicht vorgereinigtes Material) bei der Reinigung über LiChroprep RP8 zu erfassen, wurde bei weiteren Aufarbeitungen nach dem Waschen mit Wasser mit 50 % Acetonitril eluiert. Unter diesen Bedingungen konnte davon

ausgegangen werden, daß die Salze und der allatotrope Faktor getrennt eluiert wurden.

3.5.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Mit dem über LiChroprep RP8 gereinigten CC-Extrakt wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt. Jeweils 0,5, 0,7, 1, 2, 4 und 6 CC-Äquivalente wurden pro CA-Paar für die Aktivierung eingesetzt. Der Extrakt wurde wie beschrieben (s. Kap. 2.6) nach 2 Stunden Präinkubation der CA dem Medium zugegeben. In dieser Zeit synthetisierten die CA durchschnittlich ca. 15 pmol JH-III. Abbildung 23 zeigt die CA-Syntheseleistungen in vitro während weiterer 4 Stunden Inkubationszeit. Während die spontane CA-Aktivität (Kontrolle, Medium ohne CC-Extrakt) nach Präinkubation bei 25,2 pmol JH-III lag, steigerten 0,3 CC-Äquivalente die ins Medium abgegebene JH-Menge auf $43,0 \pm 11,1$ pmol, 0,5 CC auf $39,1 \pm 10,3$ pmol und 0,7 CC auf $48,8 \pm 10,9$ pmol. Die größte Stimulierung der CA wurde mit einem Extrakt aus einem CC erreicht ($69,4 \pm 17,9$ pmol JH-III). Ein Zusatz von mehr als einem CC-Äquivalent schien keine zusätzlich aktivierende Wirkung zu besitzen; die Aktivierbarkeit der CA erreichte mit einem CC-Äquivalent ein Plateau. Da bei der Anreicherung des Allatotropins mit Verlusten gerechnet werden mußte, wurde für die Aktivierung der JH-III-Synthese ein Extrakt von 2 - 4 CC-Äquivalenten pro Inkubationsansatz (CA-Paar) verwendet.

Ferenz et al.¹⁰⁹ untersuchten die stimulierende Wirkung von bis zu einem CC-Äquivalent. Dabei wurde eine deutliche Aktivierung der CA ab 0,5 CC-Äquivalenten (über Sephadex G10 gereinigt) erreicht, geringere Substanzmengen besaßen keine Wirkung. Die 5 - 20fache Stimulierung durch ein CC-Äquivalent wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet.

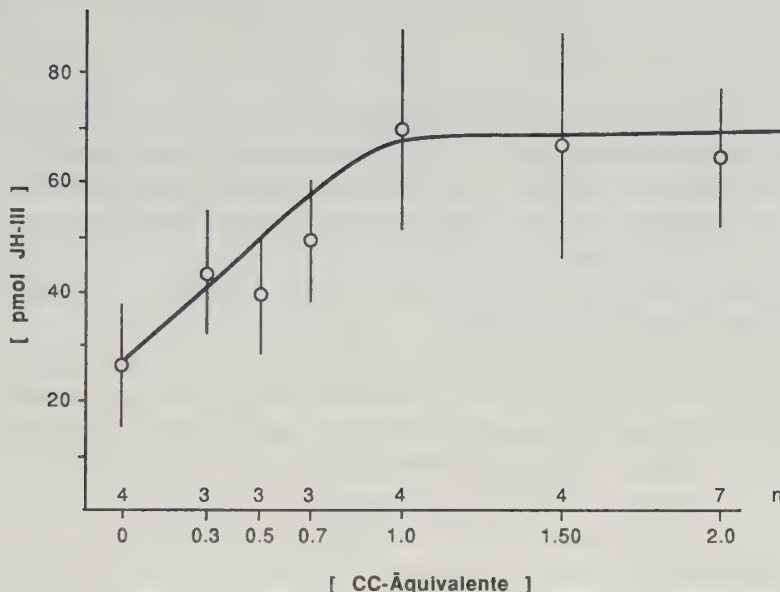


Abb. 23 Dosis-Wirkungskurve von gereinigtem CC-Extrakt (über LiChroprep RP8) im CA-Test. Die mittlere JH-III-Synthese/CA-Paar während 4 Stunden Inkubationszeit (nach 2 Stunden Präinkubation) unter dem Einfluß von 0, 0,3, 0,5, 0,7, 1 und 2 CC-Äquivalenten ist in pmol JH-III angegeben.

3.5.5 Anreicherung des Allatotropins durch HPLC

3.5.5.1 Chromatographie von vorgereinigtem CC-Extrakt

Die in Kapitel 3.5.3 beschriebene Reinigung des Extrakts an LiChroprep RP8 sollte auch mit schneller Flüssigchromatographie möglich sein. Die Trennung von Peptiden, speziell von Neuropeptiden aus Invertebraten, mit HPLC an derivatisiertem Kieselgel (reversed phase) wird bereits in mehreren Arbeitsgruppen angewandt^{2,5,13,14,21}. Vorgereinigter CC-Extrakt (aktive Fraktion C-2 nach Sephadex G15-Chromatographie über LiChroprep gereinigt) aus Locusta migratoria wurde an zwei verschiedenen stationären Phasen (Shandon ODS und Vydac TR RP) chromatographiert. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch von Wasser und Acetonitril, dem Puffer zugegeben wurde. Um auch geringe Substanzmengen wiederzufin-

den, wurde mit der Wellenlänge (206 nm) detektiert, bei der die Säureamidbindung im UV-Bereich absorbiert¹¹¹. Acetonitril-Proben von verschiedenen Herstellern besaßen bei 206 nm unterschiedliche Extinktionskoeffizienten. Genügend durchlässig war bei dieser Wellenlänge das LiChrosolv-Acetonitril der Fa. Merck. Der Puffer mußte folgenden Anforderungen gerecht werden:

- Er mußte durch Lyophilisieren entfernbar sein, da die eluierten Substanzen im in vitro Test auf ihre biologische Aktivität überprüft werden sollten.

- Die Eigenabsorption des Puffers bei 206 nm durfte in der effektiven Konzentration nicht so hoch sein, daß die Absorption der Substanzen verdeckt wurde.

Trifluoressigsäure (0,1 %ig) und Ammoniumacetat (0,02 M, pH des Stammpuffers 0,04 M 5.2) genügten diesen Ansprüchen. Da die Trennung biologischen Materials unter isokratischen Bedingungen problematisch ist (die ersten Peaks werden schlecht aufgelöst, während die letzten breit und flach eluiert werden und im Grundrauschen untergehen können), wurde mit einem kontinuierlichen, linearen Lösungsmittelgradienten gearbeitet. Die Konzentration des Puffers blieb dabei unverändert. Die Verwendung eines Lösungsmittelgradienten erlaubte eine zufriedenstellende Trennung von Peptiden in vertretbarer Zeit, da die Elutionskraft der mobilen Phase zunahm. Das Verfahren hatte aber den Nachteil, daß die Säule anschließend wieder regeneriert werden mußte. Unter diesen Bedingungen dauerte die Chromatographie einschließlich Regenerieren 75 Minuten. Auch bei kontinuierlichen Gradienten können durch Entmischungseffekte Scheinbanden auftreten, besonders dann, wenn die Mischung auf der Niederdruckseite der HPLC erfolgt. Der Anstieg der UV-Absorption nach 6 - 8 Minuten war durch die steigende Acetonitrilkonzentration bedingt (s. Abb. 29). Ebenso waren die unmarkierten Peaks des Chromatogramms in Abbildung 29 ab 30 Minuten

Retentionszeit und am Ende des Regenerierens auf Konzentrationsveränderungen des Lösungsmittelgemisches zurückzuführen. Diese Banden traten auch nach Injektion von reinem Lösungsmittel auf.

Bei der Chromatographie eines über Sephadex G15 und LiChroprep RP8 vorgereinigten Extrakts aus 17 - 20 CC an Shandon ODS konnten wesentlich weniger Substanzen detektiert werden, als nach einer Trennung über eine Vydac TP RP-Säule unter gleichen Bedingungen (Abb. 24 und 25). Für die weitere Anreicherung des Allatotropins durch HPLC wurde deshalb Vydac TP RP-Material als stationäre Phase verwendet.

Obwohl der CC-Extrakt entfettet und durch LiChroprep-Filtration vorgereinigt war, entstanden beim erneuten Lösen der Substanzen Trübungen. Dies ist wahrscheinlich auf die Bildung hochmolekularer Aggregate zurückzuführen. Um das Verstopfen der Fritte am Säulenkopf und den damit verbundenen starken Druckanstieg innerhalb der Apparatur zu verhindern, wurde der Extrakt vor dem Injizieren in die Probenschleife filtriert (s. Kap. 2.9.3).

Ein typisches Chromatogramm eines Extrakts aus 75 entfetteten Drüsen, die über Sephadex G15 und LiChroprep vorgereinigt waren, ist in Abbildung 26 gezeigt. Da eine vollständige Trennung eines komplexen (biologischen) Materials durch eine einmalige Chromatographie nicht erreicht werden konnte und das Testen der einzelnen Peaks die Kapazität des CA-Testes überstieg, wurde das Eluat in 4 Fraktionen (H-1 bis H-4) geteilt und lyophilisiert. In Fraktion H-1 wurden die Substanzen ab dem Frontpeak bis zur ersten großen UV-Absorption gesammelt (dies entsprach einer Retentionszeit von ca. 28 Minuten). Im in vitro-Test lagen die Spontanaktivitäten mit einem mittleren Zuwachs von 7,3 pmol JH-III/CA-Paar x 4 h relativ niedrig (Tab. 14); dementsprechend war auch die Aktivität der stimulierten CA (in absoluten JH-Werten) geringer (s. Kap. 3.3.3). Die

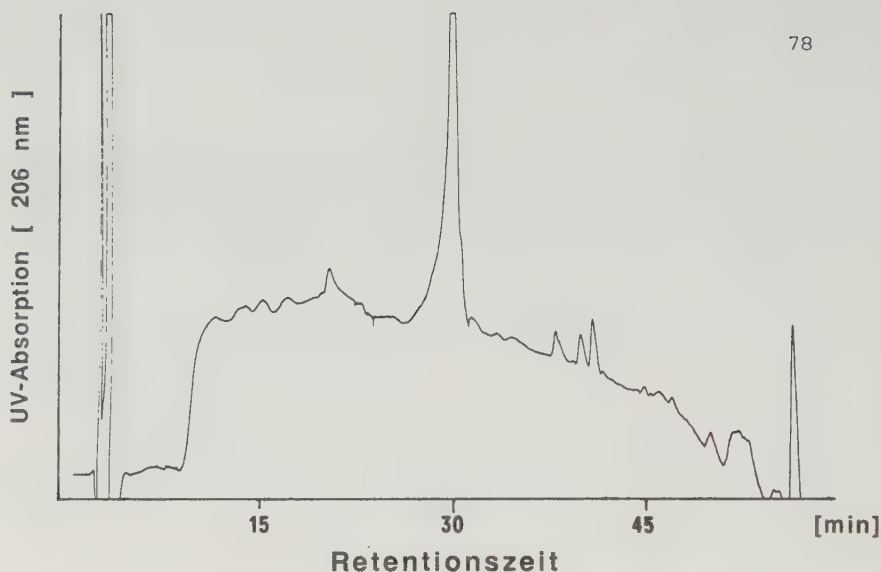


Abb. 24 HPLC-Chromatogramm eines Extrakts aus ca. 20 CC an Shandon ODS unter den gleichen HPLC-Bedingungen wie in Abb. 25 beschrieben.

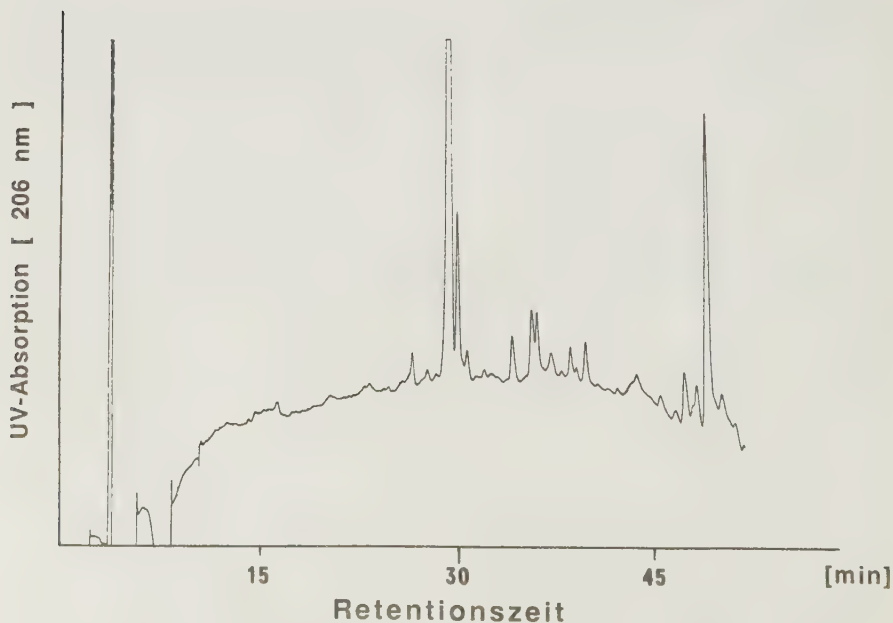


Abb. 25 Trennung eines Extrakts aus 20 CC über eine Vydac TP RP-Säule. HPLC-Bedingungen: Säule 25 cm x 0,5 cm i.D., Durchfluß 1,0 ml/min, UV-Detektor 206 nm, Lösungsmittel Puffersystem I (s. S. 14), Konzentrationsanstieg des Acetonitrils 1 %/min.

allatotrope Aktivität konnte im Biotest in den Bereichen H-1 und H-2 lokalisiert werden. Substanzen, die mit einer höheren Acetonitrilkonzentration eluiert wurden (Fraktionen H-2, H-3 und H-4), besaßen keine deutliche allatotrope Wirkung. Gleichzeitig wurde die aktive Fraktion nach der LiChroprep-Reinigung (vor HPLC-Fraktionierung) getestet. Obwohl die Gesamtaktivitäten der CA in diesem Test niedrig waren, konnte durch Zugabe aktiver Fraktionen eine 3 - 4fache Steigerung der JH-III-Synthese erzielt werden.

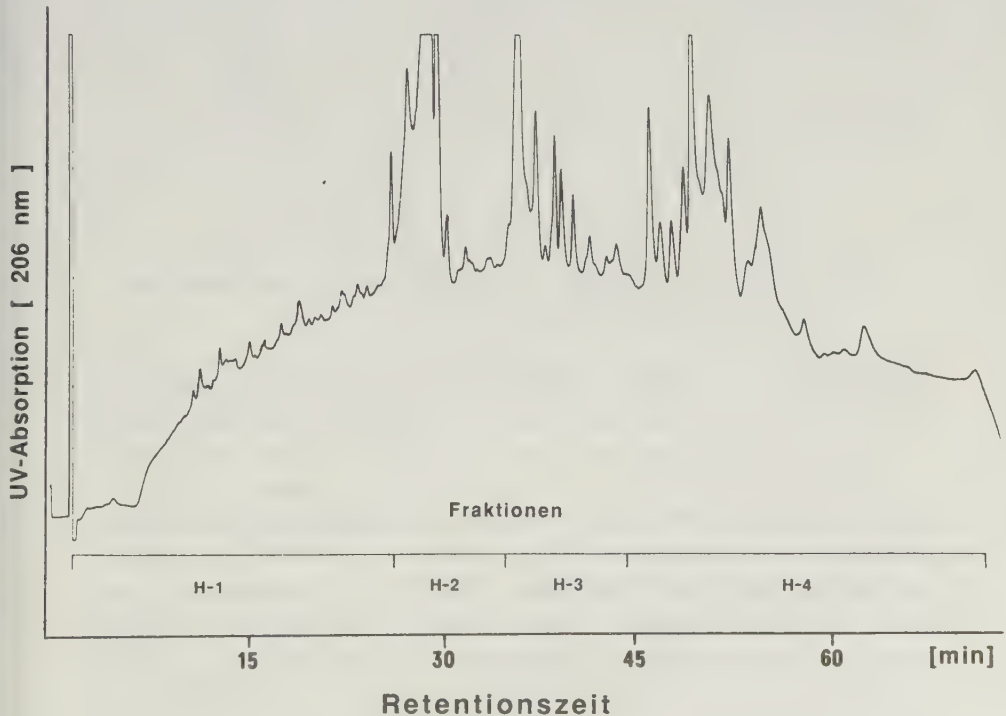


Abb. 26 HPLC-Chromatogramm von 75 vorgereinigten CC (entfettet, Chromatographie über Sephadex G15, Reinigung über LiChroprep PR8). Das Eluat wurde in 4 Fraktionen (H-1 bis H-4) geteilt (HPLC-Bedingungen s. Abb. 25).

Tabelle 14 Stimulierung der JH-Biosynthese in vitro durch HPLC-Fractionen von CC-Extrakt. Es wurden pro Inkubationsansatz 2,5 CC-Äquivalente zugegeben.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
Kontrolle	7	7,2 $\pm$ 2,2	100 $\pm$ 30,6
Fraktion H-1	6	31,6 $\pm$ 12,7	438,9 $\pm$ 176,4
Fraktion H-2	6	8,6 $\pm$ 4,6	119,4 $\pm$ 63,9
Fraktion H-3	7	8,1 $\pm$ 3,1	112,5 $\pm$ 43,0
Fraktion H-4	7	9,7 $\pm$ 5,4	134,7 $\pm$ 75,0
50 % Acetonitril-			
Fraktion nach	5	22,6 $\pm$ 5,7	313,9 $\pm$ 79,2
LiChroprep			

3.5.5.2 Fraktionierung von entfettetem CC-Extrakt ohne Vorreinigung über Sephadex

Es wurde versucht, die Anreicherung des ATH zu vereinfachen. Ein Methanolextrakt von 60 CC wurde deshalb ohne Sephadex-Chromatographie an LiChroprep RP8 adsorbiert und die ATH-Aktivität mit 50 % Acetonitril/Wasser eluiert. Anschließend wurde das Eluat unter den in Kap. 2.5.2 beschriebenen HPLC-Bedingungen chromatographiert. Die höhere UV-Absorption dieses Chromatogramms (Abb. 27) zeigte, daß der Extrakt aus 60 CC (ohne Sephadex G15-Filtration) eine wesentlich größere Peptidmenge enthielt als der aus 75 über Sephadex vorgereinigten Drüsen (Abb. 26). Die Bedingungen beider Chromatographien waren identisch. Allein durch die Gelfiltration gingen demnach etwa 50 % des eingesetzten Materials verloren. Da aber für die biologischen Tests, in denen Sephadex-Fractionen untersucht wurden, immer mindestens zwei CC-Äquivalente eingesetzt wurden, konnte

sich ein derartiger Verlust nicht in den Testergebnissen bemerkbar machen (s. Kap. 3.5.2).

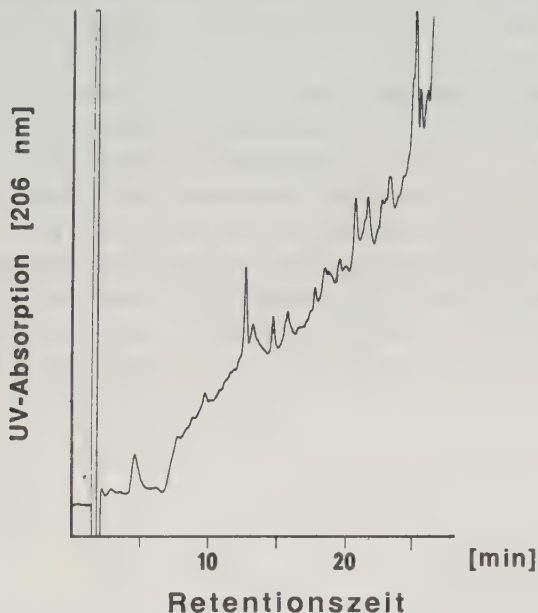


Abb. 27 HPLC-Chromatogramm von 60 CC-Äquivalenten nach Entfettung und Reinigung über LiChroprep RP8. Die HPLC-Bedingungen waren denen, in Abb. 25 angegebenen, identisch.

3.5.5.3 Fraktionierung von Gehirn- und CC-Material

Um die Ausbeute an allatotropem Faktor zu erhöhen, wurden Gehirne und CC aus 67 Wanderheuschrecken präpariert und gemeinsam, wie in Kapitel 2.9 beschrieben, aufgearbeitet. Ein Vergleich des HPLC-Chromatogramms eines CC-Extrakts (60 CC, Abb. 27) mit dem eines gemischten Extrakts (67 Gehirne mit CC, Abb. 28) zeigte, daß der CC-Extrakt eine größere Anzahl Substanzen mit niedrigen Retentionszeiten besaß als ein Extrakt aus beiden Organen. Die UV-Absorptionen der niedermolekularen Stoffe, die erfahrungsgemäß in dem Bereich bis zu ca. 30 % Acetonitril/Wasser/TFA (Fraktion

H-1) eluiert werden, war im CC-Extrakt deutlich höher. Dies wies auf eine größere Menge dieser niedermolekularen Substanzen hin.

Die ATH-Aktivität wurde auch bei dem Extrakt aus Gehirnen und CC mit 28 ml Elutionsmittel desorbiert (Tab. 15, Fraktion GH-1). Die JH-III-Biosynthese wurde durch Fraktion GH-1 um das 2,5 - 3fache im Vergleich mit den Kontrollen gesteigert. Die folgende Fraktion GH-2/3, bis zur Retentionszeit von 45 Minuten (dies entsprach den Fraktionen H-2 und H-3 von Abb. 26), stimulierte die spontane Aktivität der CA in vitro leicht. Die Fraktion GH-4 mit einem Retentionsvolumen von 45 - 60 ml zeigte keine allatotrope Wirkung.

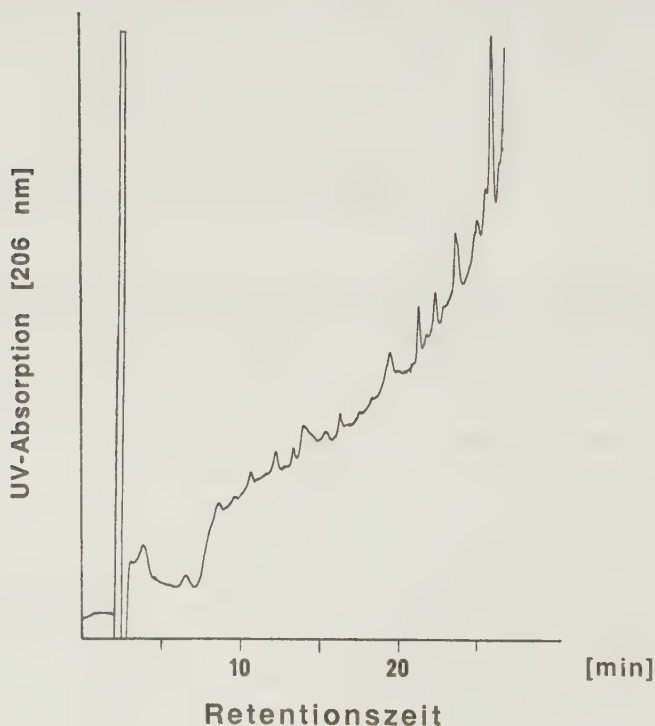


Abb. 28 Fraktion GH-1 der HPLC-Chromatographie von vereinigttem Gehirn- und CC-Extrakt (je 67 Organe, HPLC-Bedingungen s. Abb. 25)

Tabelle 15 Stimulierung der CA in vitro durch HPLC-Frak-tio-nen von vereinigttem Gehirn- und CC-Material. Nach 2 Stunden Präinkubation wurden 1,3 CC-Äquivalente/CA-Paar zugesetzt und die JH-III-Synthese während weiterer 4 Stunden gemessen.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
Kontrolle	4	23,5 $\pm$ 19,8	100 $\pm$ 84,3
Fraktion GH-1	4	73,2 $\pm$ 15,6	311,5 $\pm$ 66,4
Fraktion GH-2/3	4	30,2 $\pm$ 9,2	128,5 $\pm$ 39,2
Fraktion GH-4	4	27,1 $\pm$ 12,0	115,3 $\pm$ 51,5

3.5.5.4 Chromatographie von AKH

Mordue et al.¹ haben 1976 mit dem Adipokinetischen Hormon (AKH) das erste Neurohormon aus Insekten, nämlich aus Locusta-CC, isoliert und seine Struktur aufgeklärt. Es ist ein N-terminal-blockiertes Dekapeptid, das den Lipidstoffwechsel aktiviert. Von einer Vydac TP RP-Säule wurde synthetisches Locusta-AKH mit 28,5 - 29 % Acetonitril/Wasser (0,1 % TFA) eluiert (Abb. 29). Bei den UV-Signalen, die erst nach 40 Minuten erschienen, handelte es sich um Substanzen aus dem Lösungsmittelgemisch oder um Entmischungseffekte des Laufmittels. Sie waren auch auf den Chromatogrammen mit reinen Lösungsmitteln zu erkennen. Da diese "Substanzen" erst weit nach dem ATH erschienen, hatten sie keinen Einfluß auf dessen Elution. Sie besaßen auch keine Wirkung auf die CA im in vitro-Test (s. Tab. 14 und 15). Auf Grund der Retentionszeiten konnte die erste hohe UV-Absorption auf den Chromatogrammen von CC-Extrakt nach ca. 28 Minuten als AKH identifiziert werden (Abb. 29). Dieses Hormon ist offensichtlich in größeren Mengen in den Drüsen gespeichert. Bezogen auf die UV-Absorption und gleicher Absorptionskoef-

fizient vorausgesetzt, betrug die Menge der Substanz mit dem größten Signal in dem Bereich mit ATH-Aktivität etwa ein Siebzigstel des AKH. AKH eignete sich als innerer Standard, um die Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten zu kontrollieren. Auf Grund der vorliegenden Testdaten hat AKH offensichtlich keinen Einfluß auf die CA-Aktivität *in vitro*, da es in Fraktion H-2 getestet wurde (s. Tab. 14).

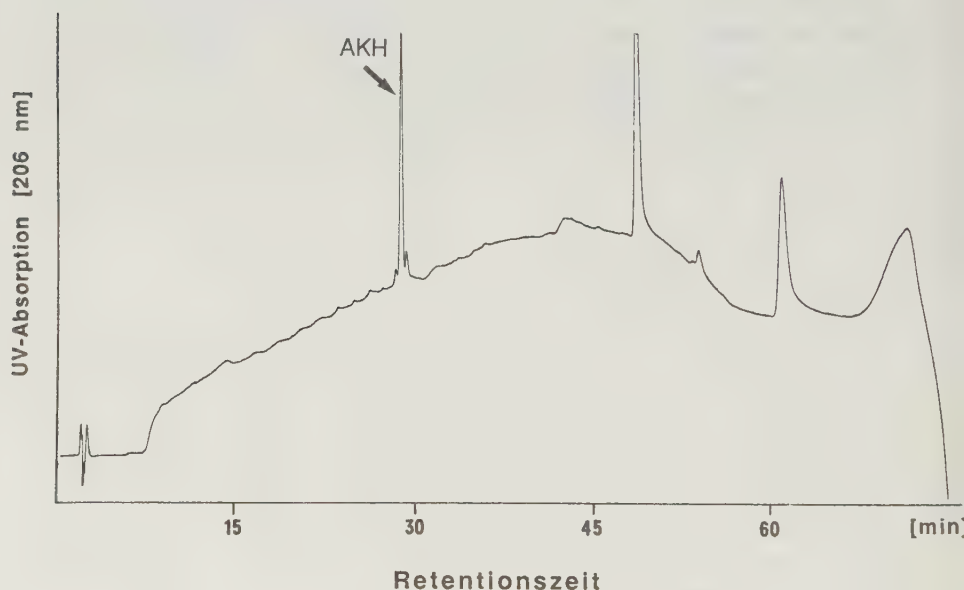


Abb. 29 HPLC-Chromatogramm von synthetischem Locusta-AKH an Vydac TP RP-Material (HPLC-Bedingungen s. Abb. 25)

3.5.5.5 Rechromatographie der Fraktion H-1 mit flachem Gradienten

Niedermolekulare Substanzen aus dem CC-Extrakt (Fraktion H-1, s. Abb. 26 und 27) wurden mit einem flacheren Gradienten auf der Vydac-Säule rechromatographiert, um eine bessere Auftrennung zu erhalten. Der Konzentrationsanstieg von

Acetonitril (0,1 % TFA) wurde auf 0,5 %/Minute verringert. Abbildung 30 zeigt das Chromatogramm eines Extrakts aus 50 CC mit den dazugehörigen Ergebnissen des CA-Tests. Die UV-Absorption einzelner Peaks war bis auf wenige Ausnahmen nur wenig höher als das Grundrauschen, das bei 206 nm und zusätzlich empfindlicher Detektoreinstellung deutlich zu erkennen war. Einzelne Substanzen wurden aber so weit voneinander entfernt eluiert, daß die Peaks vollständig getrennt waren. Die letzte große UV-Absorption stammte von der Substanz, die kurz vor dem AKH eluiert wurde. Ihre Retentionszeit erhöhte sich durch den flacheren Gradienten von ca. 28 auf 55 Minuten. Während der Rechromatographie wurde das Eluat in 4 - 8 ml-Portionen gesammelt und ein Aliquot von 2,5 CC (der 50 Drüsen) für die Aktivierung eines CA-Paares benutzt. Nach der Präinkubation (2 Stunden) erreichte die Spontanaktivität der CA während der folgenden 4 Stunden 23,4 pmol JH-III/CA-Paar. Diese Syntheserate wurde auch von den CA erreicht, die mit den Fraktionen RH-1 und RH-2 behandelt wurden. Mit der Fraktion RH-4, die mit ca. 20 % wässrigem Acetonitril (mit 0,1 % TFA-Puffer) eluiert wurde, wurde die CA-Syntheseaktivität der CA um das 2,5fache gesteigert. Eine leichte Aktivierung um das 1,5fache der spontanen JH-III-Biosynthese erfolgte auch durch die Fraktionen RH-3 und RH-5. Dagegen hatte die Fraktion RH-6 eine leicht desaktivierende Wirkung auf die JH-Biosynthese in vitro.

Der restliche CC-Extrakt (40 Drüsen) der am stärksten aktiven Fraktion (RH-4) wurde nochmals unter den gleichen Bedingungen chromatographiert. Die Substanzmenge war aber so gering, daß bei 206 nm keine deutliche Absorption zu erkennen war. Der Substanzverlust ist auf wiederholtes Überführen in andere Gefäße, Chromatographieren und Lyophilisieren zurückzuführen. Da es nicht möglich war, einzelne Peaks zu sammeln, wurde der Bereich mit der allatotropen Aktivität (RH-4) in sechs Abschnitte geteilt. Im Biotest zeigte die erste der so gesammelten Fraktionen

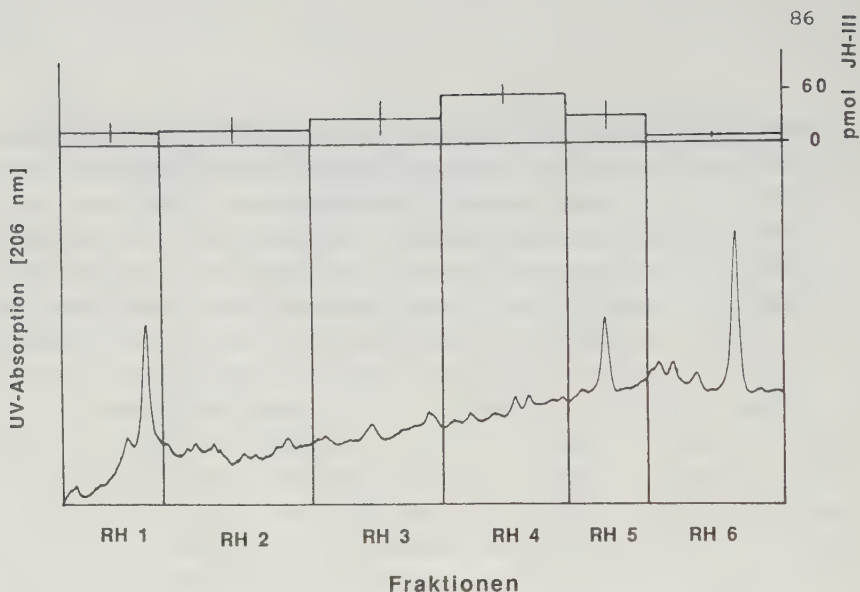


Abb. 30 Rechromatographie von Fraktion H-1 mit flachem Gradienten (Konzentrationsanstieg von Acetonitril (0,1 % TFA) 0,5 %/min, weitere HPLC-Bedingungen s. Abb. 25). Über der UV-Absorptionskurve (206 nm) sind die mittleren JH-III-Syntheseraten der CA in vitro (während 4 Stunden) angegeben, die mit der entsprechenden Fraktion getestet wurden. Die spontane Aktivität der Kontroll-CA lag bei durchschnittlich 23,4 pmol JH-III.

ATH-Aktivität ($43,0 \pm 14,1$ pmol JH-III, $n = 3$), während die folgenden Fraktionen keine stimulierende Wirkung auf die JH-Biosynthese besaßen (Kontrolle: $20,4 \pm 7,2$ pmol JH-III, $n = 4$). Unter dem Einfluß der beiden letzten Fraktionen wurde die CA-Aktivität sogar gehemmt ($11,7 \pm 8,4$ pmol, $n = 3$, und $12,5 \pm 11,8$ pmol JH-III/CA-Paar x 4 h, $n = 4$).

Obwohl auf dem Chromatogramm außer dem Grundrauschen keine andere UV-Absorption zu erkennen war, konnten in der Sequenzanalyse des Extrakts von 30 Drüsen der ersten Fraktion noch 65 pmol Protein gemessen werden. Die geringe Aktivierung der CA in vitro ist wohl auf die geringe Substanzmenge zurückzuführen.

Mehrere hundert CC wurden wie beschrieben extrahiert und

portionsweise über LiChroprep und HPLC (Anstieg der Acetonitrilkonzentration 1 %/min) fraktioniert. Das Eluat bis zur Retentionszeit von 28 Minuten wurde für die weitere Aufarbeitung verwendet. Die Rechromatographie dieses Eluats wurde bei einem flacheren Anstieg der Acetonitrilkonzentration mit 0,1 % TFA (Anstieg 0,5 %/min) durchgeführt. Die ATH-Aktivität wurde nach 24,5 bis 30,8 Minuten eluiert (Tab. 16).

Tabelle 16 Wirkung von CC-Extrakt nach zweimaliger HPLC auf die JH-III-Biosynthese. Nach 2 Stunden Präinkubation wurden 2,5 CC-Äquivalente zugegeben und die JH-III-Synthese während weiterer 4 Stunden gemessen.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
Kontrolle	4	5,4 ± 3,4	100,0 ± 63,0
Fraktion 7	4	3,0 ± 1,1	55,6 ± 20,4
Fraktion 9	5	7,0 ± 5,8	129,6 ± 107,4
Fraktion 10	3	13,7 ± 9,7	253,7 ± 179,6
Frakt. 11-13	7	20,4 ± 12,4	377,8 ± 229,6
Frakt. 14-15	8	4,7 ± 1,4	87,0 ± 25,9

Der Bereich mit allatotroper Aktivität wurde nochmals mit dem gleichen Lösungsmittelgradienten chromatographiert; statt TFA-Puffer (0,1 %) wurde Ammoniumacetatpuffer (0,02 M) verwendet. Das Chromatogramm ist in Abbildung 31 dargestellt. Mit Hilfe des CA-Tests konnten zwei allatotrop wirksame Fraktionen ermittelt werden, die deutlich voneinander getrennt eluiert wurden (Tab. 17). Die spontane JH-III-Biosynthese wurde durch die Fraktion A-8 um den Faktor 5,7 gesteigert, durch die Fraktion A-5 um den Faktor 3.

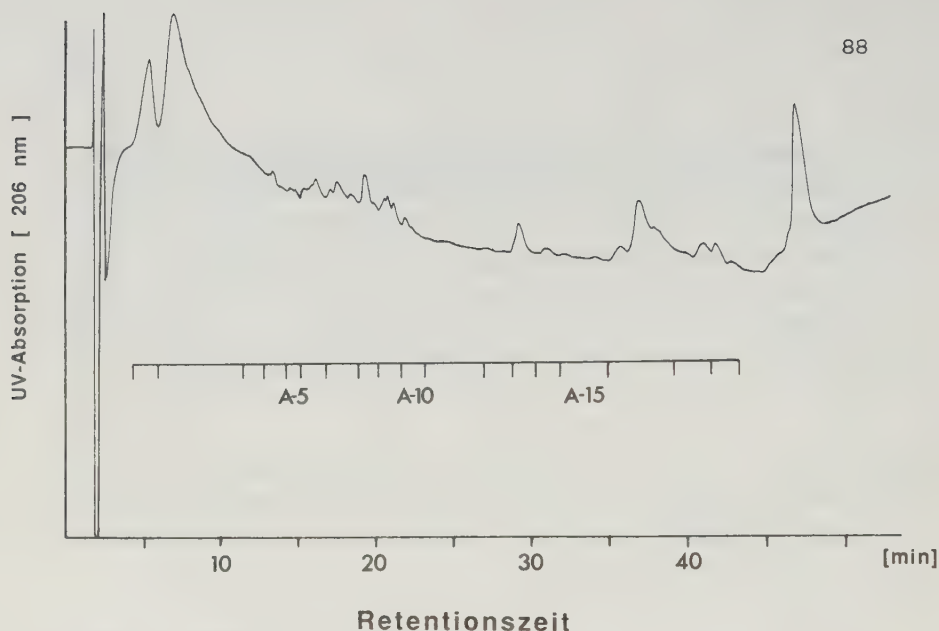


Abb. 31 UV-Absorptionskurve einer HPLC-Chromatographie mit Ammoniumacetatpuffer von 90 vorgereinigten CC-Äquivalenten. Der Gradientenanstieg von 20 bis 56 % Puffer B (Puffersystem II, s. S. 14) betrug 0,5 %/min, sonstige HPLC-Bedingungen s. Abb. 25. Gesammelt wurden die Fraktionen A-1 bis A-18.

Tabelle 17 Aktivierung von Locusta-CA in vitro durch CC-Extrakt nach HPLC-Fraktionierung mit Ammoniumacetat-Puffer. Aktiviert wurde mit 2,5 CC-Äquivalenten.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
Kontrolle	5	5,2 ± 2,5	100 ± 48,1
Fraktion A-10	4	5,7 ± 1,8	109,6 ± 34,6
Fraktion A-9	4	9,4 ± 4,1	180,8 ± 78,8
Fraktion A-8	4	30,0 ± 7,9	576,9 ± 151,9
Fraktion A-7	4	5,9 ± 2,1	113,5 ± 40,4
Fraktion A-6	4	5,5 ± 2,3	105,8 ± 44,2
Fraktion A-5	3	16,2 ± 1,7	311,5 ± 32,7
Fraktion A-3	3	6,1 ± 1,5	117,3 ± 28,8

3.6 Charakterisierung des ATH

3.6.1 Verdauung mit Trypsin und Pronase

Erste Hinweise auf den Peptidcharakter des ATH haben Versuche erbracht, den allatotropen Faktor mit Antikörper gegen Locusta-Gehirne abzufangen⁶³. Um ATH näher zu charakterisieren, wurde die allatotrop wirksame Fraktion C-2 der Sephadex G15-Chromatographie (s. Kap. 3.5.2) mit Trypsin und Proteinase K behandelt. Enzyme und verdautes Peptidmaterial wurden durch einfache Filtration an LiChroprep RP8 getrennt (s. Kap. 2.10). Während Trypsin und Proteinase K an RP-Kieselgel zurückgehalten wurden, wurde hydrolysiertes Peptid bzw. Allatotropin mit 30 %- oder 50 %igen Acetonitril eluiert. Im in vitro-Test konnte hydrolysiertes CC-Extrakt die CA-Syntheseleistung nicht steigern (Tab. 18), während die unbehandelte Fraktion C-2 (der Sephadex G15-Chromatographie) die JH-Biosynthese um den Faktor 2,7 stimulierte. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß das aktive Prinzip ein Peptid oder Protein ist.

Tabelle 18 Wirkung von Trypsin und Pronase auf die allatotrope Aktivität in Fraktion C-2 (Sephadex G15). Eingesetzt wurden 2 CC-Äquivalente/CA-Paar in vitro.

	n	pmol JH-III /CA-Paar x 4 h	Zuwachs in %
<u>für Trypsin:</u>			
Kontrolle	8	34,2 $\pm$ 14,8	100 $\pm$ 43,3
C-2	8	94,9 $\pm$ 36,7	277,5 $\pm$ 107,3
C-2 nach Verdauung	8	49,0 $\pm$ 18,6	152,2 $\pm$ 57,8
<u>für Pronase:</u>			
Kontrolle	4	28,4 $\pm$ 15,1	100 $\pm$ 53,2
C-2	3	73,8 $\pm$ 49,3	259,9 $\pm$ 138,4
C-2 nach Verdauung	8	29,6 $\pm$ 5,1	104,2 $\pm$ 17,9

3.6.2 Abschätzung der Molekülgröße

Das Allatotropin wurde mit 80 % wässrigem Methanol aus entfetteten CC extrahiert. An Sephadex G10 lief die biologische Aktivität mit der Ausschlußgrenze. Nach der Chromatographie an Sephadex LH20 ließ sie sich eindeutig hinter der Front lokalisieren. Von Sephadex G15 wurde CC-Material mit insgesamt 158 ml Elutionsmittel (Fraktion C-2) eluiert. Sephadex G15 trennt Stoffe bis zu einem Molekulargewicht von MG 1500, Sephadex G10 bis zu MG 700. Demzufolge besitzt der allatotrope Faktor ein Molekulargewicht zwischen 700 und 1500.

Auch die Elution des ATH von LiChroprep mit höchstens 50 % Acetonitril und von Vydac-Material bei der HPLC mit saurem ca. 20 %igen Acetonitril ließen auf ein niedriges Molekulargewicht schließen. Durch eine vorläufige Aminosäurenanalyse wurde diese Annahme bestätigt. Obwohl bei der verwendeten Methode Tryptophan, Prolin und Cystin/Cystein nicht erfaßt wurden, ließ sich an Hand der gefundenen Aminosäuren ein Molekulargewicht von mindestens 1371 D errechnen.

Mit der Einschränkung, daß die geringe Materialmenge der aktiven Fraktion (nach der dritten HPLC) nicht durch Aminosäuren aus Glasgefäßen oder Lösungsmittel bei der Reinigung kontaminiert worden ist, konnte folgendes Verhältnis der Aminosäuren angegeben werden: 1 Asparagin/Asparaginsäure, 2 Glutamin/Glutaminsäure, 2 Serin, 3 Glycin, 2 Valin, 1 Leucin, 1 Lysin. Im Vergleich dazu besitzt AKH die Aminosäuresequenz pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-ThrNH₂.

3.6.3 Ausbeutebestimmung und Anreicherung während der Reinigung

Eine Proteinbestimmung mit dem BIO-RAD-Assay⁸³ nach jedem Reinigungsschritt des biologischen Extraktes ergab folgende Ergebnisse (Tab. 19).

Tabelle 19 Anreicherung der allatotropen Aktivität aus 20 entfetteten CC von erwachsenen Locusta migratoria-Weibchen während der Reinigungsprozedur

	µg Peptid/20 CC	Anreicherung
Methanolextrakt	21,6	0
Sephadex G15	18,3	1
LiChroprep RP8	4,5	5
HPLC-Fraktionierung	4×10^{-2}	500

Der Methanolextrakt aus 20 CC enthielt noch 21,6 µg Peptid. Nach der Chromatographie an Sephadex G15 (Fraktion C-2) und der Reinigung über LiChroprep RP8 wurden nur noch 4,5 µg Peptid in 20 CC-Äquivalenten gemessen. Die durch Aminosäurenanalyse bestimmte Peptidmenge nach drei aufeinanderfolgenden HPLC-Chromatographien betrug noch 4×10^{-2} µg. Wird diese Peptidmenge auf ein Tiergewicht von zwei Gramm bezogen, wurde ATH sogar um den Faktor 10^8 angereichert.

4. DISKUSSION

4.1 Zusammenhang zwischen JH-Titer und CA-Aktivität

Die JH-Werte der L. migratoria-Hämolymphe, die bei mehr als 40 Einzeltieren mit der GC-MS-Methode gemessen wurden, stimmen gut mit den in ganzen Tieren gemessenen Werten⁹⁴ überein, auch unter Berücksichtigung des Hämolympfvolumens. Der JH-III-Gehalt ist bei den ganzen Tieren bis zum Tag 5 nach der Adulthäutung (Prävitellogenese) niedrig. Zwischen Tag 6 und 9 steigt er um das 10fache an, was mit einem hohen Vitellogeningehalt der Hämolymphe einhergeht^{60,112}. Einzeltiere können von Tag 10 bis Tag 12 nahezu 500 pmol JH-III enthalten. Vor der Eiablage an Tag 16 (Tag-Nacht-Rhythmus) fällt der JH-Titer stark ab, wie es auch in den Hämolympheproben zu beobachten ist. Zum Zeitpunkt der Eiablage beginnt der JH-Titer sowohl im ganzen Tier als auch in der Hämolymphe wieder anzusteigen, was mit dem Beginn des zweiten gonadotropen Zyklus übereinstimmt. Unterschiede zu den in Kapitel 3.3.2 gezeigten Ergebnissen beschränken sich auf die Dauer des Oocytenwachstums und sind auf die niedrigere Nachttemperatur bei Tag-Nacht-Rhythmus zurückzuführen.

JH-III-Titerkurven anderer Arbeitsgruppen^{113,114,115} von adulten Locusta migratoria-Weibchen, die sie mit GC-MS bestimmt hatten, bestehen nur aus wenigen Meßpunkten, die zudem mit vereinigten Hämolympheproben mehrerer Tiere bestimmt waren. Couillaud et al.¹¹³, die JH-III in gesammelter Hämolymphe von mehr als 50 Weibchen gemessen haben, finden eine stetige Zunahme von JH-III während der Prävitellogenese und der Vitellogenese. Der größte JH-Gehalt in der Hämolymphe wurde mit 25 ng/ml Hämolymphe (93,8 pmol/ml) gegen Ende der Eireifung (Choriogenese) gemessen. Im Vergleich dazu liegen die in dieser Arbeit gemessenen Werte um den Faktor 4 - 8 höher. Porcheron et al.¹¹⁶ bestimmten

mit einem JH-III-RIA zwei JH-Titerkurven von Schistocerca gregaria während des ersten gonadotropen Zyklus für zwei verschiedene Zuchttemperaturen und einen Tag-Nacht-Rhythmus (12 h-Photoperiode, Nachttemperatur 20 °C). Der erste Eireifungszyklus dauert bei 28 °C fast doppelt so lange wie der bei 33 °C, aber der Verlauf der JH-III-Titer in der Hämolymphe von Weibchen ist bei 28 ° und 33 °C bezogen auf den Entwicklungszustand (LTO) gleich. Ein erstes Maximum des JH-III wird mit LTO 1,5 mm erreicht und ein zweites am Ende der Vitellogenese. Unter Zuchtbedingungen von 33 °C findet die Eiablage zwischen Tag 22 - 23 statt, was mit einer starken Abnahme des JH-III in der Hämolymphe verbunden ist. Unter beiden Zuchtbedingungen wird von großen individuellen Schwankungen des JH-III der gleichen Altersgruppe berichtet. Die großen Streuungen der JH-III-Werte in der vorliegenden Untersuchung bleiben auch bestehen, wenn der JH-Titer in Abhängigkeit der LTO geordnet wird.

Auch die JH-Biosynthese in vitro verändert sich während des Eireifungszyklus. Die JH-III-Syntheseraten der CA von Melanoplus sanguinipes¹¹⁷, Periplaneta americana¹¹⁸, Schistocerca gregaria¹¹⁹, Nauphoeta cinerea¹²⁰ und Diploptera punctata⁹¹ wurden während des ersten Eireifungszyklus getestet. Die im Inkubationsmedium gemessene JH-III-Menge beträgt am Ende der Vitellogenese maximal 3,5 pmol/CA-Paar/h bei N. cinerea und fast 100 pmol/CA-Paar/h bei D. punctata. Die Synthesemaxima der anderen genannten Insekten liegen zwischen diesen Werten. Für adulte Locusta migratoria-Weibchen wurde von Ferenz et al.¹⁰⁰ die JH-Biosynthese während einer Inkubationsdauer von 2 Stunden gemessen. Im Verlauf des ersten Eireifungszyklus gibt er drei voneinander getrennte Synthesemaxima (bei LTO 2,5 mm, 4,5 - 5,5 mm und 6,5 mm, kurz vor der Eiablage) an. In der vorliegenden Arbeit werden die höchsten JH-III-Biosyntheseleistungen (Inkubation 6 Stunden) bei LTO 5,5 mm gefunden (ca. Tag 7, s. Abb. 13). Im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen steigt die CA-Aktivität zu Beginn der

Vitellogenese steiler an. Ein ähnliches Maximum der JH-Biosynthese in vitro während des ersten Eireifungszyklus wurde von Couillaud et al.⁵³ und Girardie et al.⁶² gefunden. In allen Untersuchungen nimmt die CA-Syntheseleistung bei den Weibchen vor der Eiablage ab und steigt mit dem Beginn des zweiten gonadotropen Zyklus wieder an. Die Unterschiede der CA-Aktivitäten einzelner Tiere sind während der Phase des raschen Oocytenwachstums am größten. Große individuelle Unterschiede in der JH-Biosynthese von 2 pmol JH-III/h bis zu 200 pmol-JH-III/h zeigen auch Locusta-Weibchen, deren Adulthäutung innerhalb von sechs Stunden stattfand⁹⁶. Auf Grund anderer Zuchtbedingungen bei niedrigerer Temperatur dauert der Eireifungszyklus länger. Abhängig von der Zuchttemperatur (Differenz 4 °C) zeigen die CA von Grillen Grillus bimaculatus deutliche zeitliche und quantitative Unterschiede in ihrer JH-III-Biosyntheseleistung in vitro¹²¹. Wenn die Tiere nicht unter Tag-Nacht-Rhythmus (37 °C/25 °C; 12:12 h; 16 Stunden Photoperiode^{96,97}), sondern bei konstanter Beleuchtung gehalten werden, verkürzt sich die Entwicklungsdauer. Aber weder eine genaue Datierung der Tiere noch eine Verlängerung des gonadotropen Zyklus hatten eine bessere Synchronisation der Tiere zur Folge.

In CA von Schistocerca gregaria¹²², in Periplaneta americana⁹⁵ und in Diploptera punctata^{91,123} scheint JH-III nicht in den CA gespeichert, sondern gleich nach der Synthese ins Medium abgegeben zu werden. Mit dem Galleria-Test, einem Biotest für JH, wurde in CA von adulten Locusta-Männchen JH gefunden⁵⁴. In Weibchen wurden mit GC-MS 0,3 ng JH-III/CA-Paar (1,13 pmol) gemessen¹¹⁵. Während des ersten Eireifungszyklus enthalten die CA von Locusta-Weibchen maximal 0,1 pmol JH-III/CA-Paar und gegen Ende des Eireifungszyklus (LTO 5,5 - 6,0 mm) 1 pmol JH-III/CA-Paar. Mit zunehmendem Alter, gegen Ende des zweiten Eireifungszyklus, werden 6,3 pmol JH-III/CA-Paar gemessen, was auf eine Speicherung von JH und/oder eine Hemmung der JH-Abgabe hinweist. Nachdem in einigen Insekten-CA im in vitro-Test

kein JH nachgewiesen wurde, die JH-Biosynthese in vitro altersabhängig starken Schwankungen unterliegt und radioaktiv markiertes Methionin innerhalb von 30 Minuten in JH-III eingebaut wird⁷¹, postulierten die Autoren, daß die CA in vitro die Synthesefähigkeit zeigen, die ihrem physiologischen Zustand entsprechen. Obwohl von einem direkten Zusammenhang zwischen CA-Aktivität und JH-Titer gesprochen wird, wurden bis heute beide Parameter nur an einigen wenigen Insekten im Vergleich gemessen.

In Manduca sexta-Larven¹⁰³ ist der Verlauf der in vitro-Biosynthese von JH-I mit dem JH-I- und JH-II-Titer in der Hämolymphe, gemessen mit GC-MS, nahezu identisch. Ebenso stimmen die CA-Aktivitäten von adulten Leptinotarsa decemlineata¹⁰⁶ mit den JH-Gehalten der Hämolymphe, gemessen mit dem JH-RIA unter verschiedenen Versuchsbedingungen (Kurz- und Lang-Tag-Experimente, z. T. mit Hunger und implantierten CA) überein. Die in vitro-CA-Aktivitäten der Schaben Nauphoeta cinerea^{105,120} und Diploptera punctata¹⁰⁷ steigen langsamer an als der Hämolymphe-JH-Titer (gemessen mit Galleria-Test bzw. GC-MS). Ihr Maximum erreichen beide Parameter in D. punctata gleichzeitig kurz vor Beendigung des Oocytenwachstums. Für dieses Insekt wird von einer direkten Korrelation zwischen Hämolymphe-JH-Titer in vivo und CA-Aktivität in vitro berichtet¹⁰⁷. In N. cinerea folgt das Maximum des Hämolymphe-JH-Titers einen Tag später auf das Maximum der CA-Aktivität, diese ist während des raschen Eiwachstums am größten. In allen getesteten Weibchen weisen JH-Titer und CA-Aktivitäten zum Zeitpunkt der Eiablage geringe Werte auf. Die JH-Titer der Hämolymphe, die von anderen Arbeitsgruppen gemessen wurden, stammen überwiegend von vereinigten Proben aus mehreren Tieren (bis zu 200 Weibchen¹⁰⁷). Werte für Hämolymphe-JH-Titer und CA-Aktivitäten einzelner Weibchen im Alter von 8 bis 10 Tagen wurden bisner nur von Lanzrein et al.¹⁰⁵ angegeben. Während der Phase des raschen Oocytenwachstums werden überwiegend große CA-Aktivitäten bei niedrigen Hämolymphe-JH-

Titern gemessen, gegen Ende des Oocytenwachstums ist das Verhältnis umgekehrt. Bezogen auf das gleiche Ovarrockengewicht konnte aber von den Autoren keine Beziehung zwischen beiden Parametern gefunden werden.

Messungen vereinigter Proben aus mehreren Tieren geben eine Übersicht über die physiologischen Zustände während eines gonadotropen Zyklus, dagegen liefern Bestimmungen mehrerer Parameter in einem Individuum (JH-Titer, CA-Aktivität) ein genaues Bild der biologischen Verhältnisse zu einem definierten Zeitpunkt (Alter, LTO). Die großen Streuungen der in vitro-Syntheseleistungen der CA und der JH-Titer in der Hämolymphe lassen es ungünstig erscheinen, die beiden Parameter in verschiedenen Individuen zu messen. Ebenso bedingt das Zusammenfassen von Proben mehrerer Tiere eine Ungenauigkeit. Die mikrochemische Derivatisierung, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, ermöglicht die Analyse mit 10 - 50 μ l Hämolymphe und die Bestimmung der CA-Aktivität in vitro des gleichen Individuums. Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten wurden die in dieser Arbeit gezeigten Meßwerte (für JH-Titer und CA-Aktivität) in einem bestimmten Entwicklungszustand aus demselben Tier gewonnen. Bisher wurde von der CA-Aktivität in vitro auf die physiologischen Verhältnisse in vivo geschlossen, dh. die in vitro JH-III-Synthese mit dem JH-Titer gleich gesetzt (Übersicht von Tobe und Stay⁴⁹). Sofern beide Parameter von anderen Arbeitsgruppen gemessen wurden, wurden diese Bestimmungen an verschiedenen Tiergruppen vorgenommen.

Während der Prävitellogenese steht der geringen JH-Menge in der Hämolymphe eine große JH-Biosynthese in vitro gegenüber. In der Phase der Vitellogenese und des raschen Oocytenwachstums erreicht die CA-Aktivität in vitro ihr Maximum einen Tag bevor die höchsten JH-Werte in der Hämolymphe gefunden werden (s. Abb. 13 und 14). Beide Parameter zeigen ein Minimum zum Zeitpunkt der Oviposition.

Auf Grund dieser Ergebnisse können während des ersten gonadotropen Zyklus zwei entwicklungsbedingte Phasen unterschieden werden⁷³:

- die Prävitellogenese mit steigender CA-Synthesefähigkeit in vitro, aber geringem JH-Gehalt in der Hämolymphe und

- die darauffolgende Vitellogenese mit weiter steigender CA-Aktivität in vitro und gleichzeitigem Anstieg des JH-Titers in vivo.

Locusta migratoria-Weibchen mit einer hohen CA-Aktivität besitzen nur geringe JH-Mengen in der Hämolymphe, umgekehrt synthetisieren die CA aus Weibchen mit hohem JH-Titer relativ wenig JH-III in vitro (Abb. 15). Da in dieser Phase (rasches Oocytenwachstum) die CA auch nur 1 pmol JH-III enthalten, dürften die CA ihre Syntheseaktivität auch in vivo eingestellt haben. Eine direkt proportionale Beziehung läßt sich nur aus den Meßwerten einiger Tiere ableiten. Demnach kann eine Korrelation zwischen JH-Titer in vivo und CA-Aktivität in vitro für L. migratoria nur in Abhängigkeit des Alters angegeben werden, dagegen beträgt dieser Faktor für D. punctata während des ganzen Eireifungszyklus 0,97¹⁰⁷. Der JH-Titer der Hämolymphe ist nicht nur von der JH-III-Synthese abhängig; Aktivität der JH-Esterase, Bindung des JH an ein spezifisches Protein in der Hämolymphe (bisher nur in Locusta-Männchen untersucht¹²⁴) und Belegung der JH-Rezeptoren von Organen, die von JH reguliert werden (z.B. Fettkörper), dürften ihn wesentlich beeinflussen. Trotzdem scheint die Regulation des JH-Titers nach dem derzeitigen Wissensstand hauptsächlich durch die Biosynthese in den CA zu erfolgen⁴⁹. Für eine Aussage über die Regulation des Hämolymphe-JH-Titers und seine physiologische Bedeutung wären Bestimmungen weiterer Parameter (Esterase-Aktivität, JH-Rezeptoren) in einem Einzeltier nötig.

4.2 Steuerung der JH-Biosynthese

Die spontane CA-Syntheseleistung in vitro unterliegt Schwankungen, deren Ursachen im individuellen Entwicklungszustand liegen. Ein klarer Zusammenhang zwischen CA-Volumen bzw. Anzahl der CA-Zellen und der JH-Biosynthese wurde für L. migratoria noch nicht nachgewiesen. Während des Eireifungszyklus verändert sich zwar die Feinstruktur der CA⁴⁹, aber unterschiedliche Anfärbemuster des Cytoplasmas und bestimmter Zellorganellen, wie zum Beispiel das Endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien, konnten im Verlauf des gonadotropen Zyklus noch nicht mit der Syntheseleistung korreliert werden. Die individuellen Schwankungen der CA-Synthesefähigkeit erschweren diese Untersuchungen. Externe Einflüsse, wie Nahrung, Temperatur und Anzahl der Tiere in einer Kolonie, verändern die CA-Aktivität, die in vitro gemessen wird. Auch wurde die Wirkung von verschiedenen Manipulationen am lebenden Tier, wie zum Beispiel Durchtrennung der Nerven, Implantation von (zusätzlichen) CA und Allatektomie (verbunden mit Ovaryektomie), auf die Fähigkeit der CA zur JH-Synthese in vitro untersucht, um aus den gewonnenen Daten Rückschlüsse auf die Steuerung der JH-Biosynthese zu ziehen (Übersicht von Tobe et al.⁴⁹).

Die Nerven zwischen Gehirn und CA (über die CC) haben, je nach Insekt, einen unterschiedlichen Einfluß auf die CA-Aktivität. Eine neurale Inhibition der CA wurde u. a. für Leucophaea maderea und Diploptera punctata (erwachsene Tiere und Larven) nachgewiesen⁴⁹. In adulten Tieren von Locusta migratoria SAVIO, einer photoperiode-sensitiven Art, sind die Nerven zu den lateralen neurosekretorischen Zellen für die Hemmung der CA verantwortlich¹²⁵. Die JH-Biosynthese von D. punctata CA steigt nach Durchtrennung der Nerven zwischen Gehirn und CA an⁵⁷. In diesem Tier wird eine zusätzliche Hemmung der JH-Biosynthese durch das Ovar verursacht^{69,126}. Die nervöse Inhibition, die im Verlauf der Trächtigkeit abnimmt, scheint eine andere Ursache zu besitzen, als die

Hemmung durch das Ovar, die über die Hämolymphe vermittelt wird¹²⁶. Dagegen ist die Aktivität larvaler CA (vorletztes Larvenstadium, Locusta migratoria migratorioides) nur mit intakten Nerven zwischen Gehirn und CA (NCA I) möglich⁵³. Eine Durchtrennung der NCA I erniedrigt die JH-Biosynthese in vitro um das vierfache, in vivo erfolgt dadurch eine verzögerte Häutung zum letzten Larvenstadium. Ebenso sind in adulten Locusta migratoria-Weibchen intakte Nerven zwischen Gehirn und CC (NCC I) für eine normale JH-Biosynthese während des Oocytenwachstums erforderlich^{62,90}. Eine Denervierung der CA hat fast keinen Einfluß auf die Eientwicklung, die JH-Syntheseleistung in vitro solcher CA liegt aber weit unter dem Maximum, das in unbehandelten Tieren erreicht wird⁵³. Direkt am Gehirn durchtrennte NCC I, deren Nervenenden aber wieder auswuchsen, konnten eine normale Eientwicklung nur verzögern, nicht verhindern⁶⁰. Auch in Schistocerca gregaria sind intakte Nerven für eine normale kontinuierliche CA-Aktivität erforderlich⁵⁵.

Verschieden intensive Färbungen der neurosekretorischen Zellen bzw. des neurosekretorischen Materials im Gehirn (ebenso des Unterschlundganglions und des Protocerebrums) während des gonadotropen Zyklus weisen auf Faktoren aus dem Gehirn hin, die die CA regulieren¹²⁷. Dies bestätigten verschiedene Versuche, in denen Gehirn implantiert oder neurosekretorisches Material injiziert wurde.

Die medialen Zellen des Gehirns können im letzten Larvenstadium von Manduca sexta sowohl hemmend als auch aktivierend auf die CA wirken^{66,128,129}. In Galleria mellonella-Larven bewirken eingefrorene Gehirne nach Implantation oder Injektion in andere Tiere eine Erhöhung des JH-Titers¹⁰⁴. Messungen der CA-Aktivität in vitro zeigen, daß die CA von derart behandelten Tieren eine höhere Syntheseleistung aufweisen¹³². Die Pars intercerebralis von Locusta migratoria cinerascens-Larven wirkt allatotrop; dieser Effekt ist nicht an intakte Nervenleitungen

gebunden⁶⁷. Kauterisierung der Pars intercerebralis (PI) verlängert das vorletzte Larvenstadium von Locusta migratoria durch Hemmung der Metamorphose; eine zusätzliche Implantation von intakten neurosekretorischen Zellen verkürzt das Larvenstadium wieder durch Inhibition der CA^{67,130}. Auch die CA-Aktivität von adulten Tieren wird durch die PI unterdrückt^{61,67}. Dies steht im Widerspruch zu dem in vivo-Versuch von McCaffery und Highnam¹³¹, die am gleichen Insekt beobachteten, daß neurosekretorisches Material aus den A-Zellen der PI stimulierend auf die CA wirkt. In Schistocerca gregaria scheinen vorwiegend die lateralen neurosekretorischen Zellen stimulierend auf die CA-Aktivität zu wirken¹³³, obwohl Wechselwirkungen zwischen Pars intercerebralis und lateralen neurosekretorischen Zellen nicht ausgeschlossen werden können. Elektrische Stimulation der PI von L. migratoria fördert in vivo durch eine erhöhte JH-Biosynthese das Oocytenwachstum¹³⁴. Tobe et al.⁹⁰ untersuchten die Syntheseleistung von L. migratoria-CA in vitro bis zu sechs Tagen nach einer elektrischen Stimulation der medianen neurosekretorischen Zellen (PI) und fanden eine erhöhte JH-Biosynthese erst zwei bis drei Tage nach der Stimulierung. Eine derartige Aktivierung der lateralen neurosekretorischen Zellen zeigte nach ein bis zwei Tagen eine leicht allatotrope Wirkung. Weiterhin scheinen auch nur bestimmte Teile des Gehirns an der Hemmung der CA-Aktivität von D. punctata verantwortlich zu sein: die Regionen zwischen den lateralen und den medianen neurosekretorischen Zellen, die wahrscheinlich mit den entgegengesetzten seitlichen Regionen des Protocerebrum in Wechselwirkung treten⁴⁹.

Eine in vivo-Stimulierung von D. punctata-CA durch implantiertes Gehirn erhöhte auch die JH-Biosynthese in vitro⁶⁸. Jedoch kann auch in Abwesenheit des Gehirns eine Steigerung der CA-Syntheseleistung in vitro stattfinden, die mit dem Verlauf des gonadotropen Zyklus verbunden ist¹³⁵. Wahrscheinlich ist dabei ein allatotroper Faktor aus dem

Ovar für die Stimulierung der CA-Syntheserate verantwortlich. In D. punctata wirkt das Ovar, je nach Entwicklung der terminalen Oocyten, entweder hemmend (Prävitellogenese und Ende der Eireifung¹²⁶) oder aktivierend (wachsende Oocyten) auf die JH-Biosynthese in vitro⁶⁹. Während der Phase des raschen Oocytenwachstums ist die Stimulierung der JH-Biosynthese durch das Ovar am größten⁶⁹. Am Ende der Eireifung, der Choriogenese, hemmt das Ovar die CA-Aktivität. Auf diese aktive Hemmung wurde aus einem Versuch geschlossen, bei dem je ein Ovar mit hemmender und aktivierender Wirkung in ein ovariectomisiertes Weibchen implantiert wurde. Die daraus resultierende CA-Aktivität des Wirtstieres lag zwischen den CA-Syntheseleistungen, die durch Implantation jeweils eines Ovars verursacht wurde¹²⁶. Die Art der Wirkung des Ovars auf die CA ist noch unklar. Der Effekt des Ovars ist nicht an intakte Nerven der CA zum Gehirn gebunden¹³⁵.

Ecdysteroiden, die während der Eireifung im Ovar akkumulieren und freigesetzt werden, zeigen einen allatostatischen Effekt in D. punctata¹³⁶ und N. cinerea¹²⁰, während in L. decemlineata¹³⁷ und in M. sexta¹³⁸ der umgekehrte Effekt gefunden wurde. Die Anzahl der CA-Zellen von D. punctata wird durch Ecdysteroiden reduziert¹³⁹. 20-Hydroxyecdysone hemmt die CA-Aktivität von D. punctata in vivo, hat aber als Inkubationszusatz in vitro während 42 Stunden keinen Einfluß¹⁴⁰. Die Injektion von Ecdysone inhibiert dosisabhängig Weibchen-CA, die in Männchen implantiert und nach 8 Tagen in vitro getestet wurden. Ohne deutliche Wirkung ist Ecdysone auf Locusta migratoria-CA in vitro als Bestandteil des Inkubationsmediums^{100,141} und nach Behandlung in vivo der getesteten Weibchen¹⁴¹. Eine leichte Hemmung der JH-Biosynthese in vitro wird durch a-Ecdysone verursacht¹⁴¹.

Allatohibine oder Allatostatine sind Faktoren, die die CA in ihrer Biosynthese-Aktivität hemmen. Derartige Substanzen

wurden erst vor kurzem in vitro getestet. Rankin et al.¹⁴² fanden eine inhibierende Wirkung von Gehirn-, CC- und CA-Extrakten von D. punctata auf die JH-Biosynthese in vitro.

Die Hemmung der JH-Biosynthese in vitro, die nach Zugabe von intakten CC-Organen in dieser Arbeit beschrieben wird, können eingebrachte Esterasen durch Hydrolyse des JH-III oder nicht markierte Methylgruppen vortäuschen, die mit der ¹⁴C-Methylgruppe des Methionins bei der Veresterung konkurrieren. Beide Erklärungen sind aber für die hemmende Wirkung von Sephadex-Fractionen unwahrscheinlich, da sowohl hoch- als auch niedermolekulare Substanzen bei der beschriebenen Gelchromatographie abgetrennt werden. Durch Zugabe von CC-Organen wird die spontane JH-III-Biosynthese auf die Hälfte reduziert; Sephadex-Fractionen erniedrigen die CA-Aktivität um den Faktor 2 bis 3. Während ein auf Sephadex getrennter Gehirnextrakt sowohl eine hemmende als auch eine stimulierende Fraktion besitzt (Abb. 18), wurde durch einen anderen Extrakt, der nach der gleichen Methode fraktioniert wurde, die Biosynthese kaum beeinflusst (Tab. 10). Wahrscheinlich wurde ein hemmender Faktor bei der Elution einmal getrennt und ein anderes Mal zusammen mit Allatotropin gesammelt. Diese Beobachtungen sprechen für die Existenz eines Allatohibins in Locusta migratoria, das zusammen mit einem Allatotropin in die JH-Biosynthese eingreift.

Die Steuerung der JH-III-Biosynthese in den CA ist von mehreren Faktoren abhängig: nervöse Verbindungen zum Gehirn, Allatotropine und/oder Allatostatine des Neurosekrets, Versorgung mit Vorstufen des JH-III, Rückkopplung des Hämolymphe-JH-Titers und des Ovars mit den reifenden Oozyten (eventuell auch über Ecdyson). Außerdem scheint die Kompetenz der CA für die JH-Biosynthese eine Rolle zu spielen (s. Kap. 3.1.2, Tab. 5 und Kap. 4.3). Zur Klärung dieser Einflüsse sollte es möglich sein, die JH-III-Synthese in vivo zu messen.

4.3 Allatotropin

Durch verschiedene Manipulationen am lebenden Tier wurde die allatotrope Wirkung des Gehirns und des Ovars festgestellt (s. Kap. 4.2). Gehirnextrakt von Manduca sexta-Larven erhöhte die Aktivität von zwei linken CA in vitro um das 3 - 4fache im Vergleich zu den dazugehörigen rechten CA, deren Spontanaktivität als Kontrolle dienten^{103,143}. Ins Medium abgegebenes JH wurde nach einer 2 Stunden-Inkubation mit Hilfe eines JH-RIA für JH-I und JH-III (zusammen mit den jeweils entsprechenden Säuren) bestimmt. Gehirnextrakt stimulierte nur die JH-III-Biosynthese. Ein Extrakt des Abdominalganglions zeigte ein Viertel der in vitro-Aktivität, die mit Gehirnextrakt erreicht wird.

Auch aus dem Gehirn von Wanderheuschrecken wurde versucht, Allatotropin zu isolieren. Gadot und Applebaum¹¹⁰ extrahierten aus Gehirnhomogenat mit Methanol und Wasser einen allatotropen Faktor. Der Extrakt von einem Gehirnäquivalent steigerte die CA-Aktivität im Vergleich zu den Kontroll-CA um das Zweifache. Außer JH-III wurden aus dem Inkubationsmedium mit Hexan noch andere Substanzen (polarer als JH-III) isoliert, die aber nicht näher untersucht wurden. Im Gegensatz zur JH-III-Abgabe wurde die Abgabe dieser polaren Substanzen aus den CA durch Gehirnextrakt nicht stimuliert. Maximale Wirkung auf die JH-III-Biosynthese wurde durch den Extrakt von 0,1 Gehirnäquivalenten erreicht, wobei die CA aus älteren Weibchen eine höhere Syntheseleistung und eine stärkere Aktivierbarkeit besaßen. Diese CA wurden von Gehirnextrakt (0,1 Äquivalent) aus jungen und reifen Weibchen in gleichem Maß aktiviert. Dagegen aktivierte ein Extrakt aus einem CC von reifen Weibchen die JH-III-Biosynthese zweimal stärker als ein CC-Extrakt von einem jungen Weibchen. Demnach war Allatotropin in Gehirnen und CC reifer Weibchen in größeren Mengen vorhanden als in denen junger Weibchen.

Ein allatotroper Faktor wurde von Ferenz und Diehl¹⁰⁹ aus Gehirn, Unterschlundganglion und CC extrahiert. Ein CC-Äquivalent stimulierte die JH-Biosynthese von CA junger Weibchen um den Faktor 15 und 0,5 CC-Äquivalente um den Faktor 3,5, wobei die spontane Syntheseleistung (ohne Zusatz von CC-Extrakt) nach einer 4 Stunden-Inkubation ca. 4 pmol JH-III/CA-Paar betrug. Ferenz und Diehl¹⁰⁹ verwendeten dabei als CA-Spenderinnen junge Locusta migratoria-Weibchen, die nicht älter als 24 Stunden waren (ab der Adulthäutung). Dies steht im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen, wonach CA aus Weibchen (1 Tag alt) nicht mit CC-Extrakt über die spontane Syntheseleistung hinaus aktivierbar sind.

Eine Erhöhung der JH-Biosynthese in vitro durch gereinigten CC-Extrakt um den Faktor 2,5 - 3, nach HPLC-Chromatographie sogar um den Faktor 4 - 5, wird in der vorliegenden Arbeit belegt, dies steht in Einklang mit den von Granger et al.¹⁴³ und Gadot et al.¹¹⁰ gefundenen Stimulierung. CA aus 24 - 36 Stunden alten Weibchen, die mit der hier beschriebenen Methode nicht aktiviert werden konnten, sind auf Grund ihres physiologischen Zustandes nicht fähig, auf einen allatotropen Faktor zu reagieren. Denkbar wäre, daß noch keine freien Rezeptorstellen für ihn vorhanden sind oder daß die nötigen Enzyme noch nicht zur Verfügung stehen. Eine weitere Erhöhung der Syntheserate mit mehr als einem CC-Äquivalent wird nicht erreicht (s. Kap. 3.5.4), was auch von Ferenz und Diehl¹⁰⁹ beobachtet wurde. Die Autoren vermuteten daher im CC-Extrakt Faktoren, die die JH-Biosynthese stören. Für dieses Phänomen könnte ebenfalls begrenzte Enzymkapazität und/oder besetzte Rezeptoren verantwortlich sein.

Die unterschiedlichen Syntheseleistungen der CA in vitro werden trotz gleichen Alters und gleichen physiologischen Zustandes (LTO), die mit den verschiedenen biologischen Grundzuständen der einzelnen Tiere zusammenhängen, während

des gesamten Eireifungszyklus gefunden. Bei Versuchen, die JH-III-Biosynthese durch Gehirn- und CC-Extrakt zu stimulieren, waren immer wieder einzelne CA-Paare dabei, die auch bei Synchronisierung der Entwicklung der Tiere nicht auf die Stimulierung reagierten. Bei diesen CA wurden keine durch die Operation bedingte Verletzungen festgestellt.

Der in dieser Arbeit verwendete Biotest quantifiziert den Einbau der Methylgruppe aus ^{14}C -Methionin in JH-III, dessen ^{14}C -markierte Estergruppe bei der Bestimmung der CA-Aktivität erfaßt wird. Radioaktiv markiertes Acetat (C_2) und Mevalonat (C_6) werden in Farnesol, einer Vorstufe des JH-III eingebaut^{144,145}. Die de novo Synthese des JH wird aber unterbrochen, sobald exogene Vorstufen des JH dem Medium zugesetzt werden (z. B. Farnesensäure und seine Homologe^{70,87,91,146}). Die Zellmembranen der CA scheinen für diese zugesetzten Vorstufen durchlässig zu sein, da das endogene Substrat sogar durch geringe Konzentrationen dieser exogenen Substanzen verdünnt wird¹⁴⁷. Die JH-III-Biosynthese wird durch exogene JH-Vorstufen im Inkubationsmedium stimuliert (für Farnesol^{86,87,148}, für Farnesensäure^{70,71,146}). Während die molare Inkorporationsrate von Farnesensäure nahezu 1 ist, werden Mevalonat und Homomevalonat in geringerer Menge als Substrat verwendet. Auf Grund dieser Ergebnisse müßte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt vor oder bei der Bildung von Mevalonat liegen⁴⁹; eine genaue Definition des/der geschwindigkeitbestimmenden Enzyme steht aber noch aus.

Ein Vergleich der Messungen mit der GC-MS-Methode (Gesamt-JH-III) und der Radioaktivität (^{14}C -JH-III) von Proben aus demselben Inkubationsmedium ergaben nicht völlig geklärte Differenzen. Bei den meisten Bestimmungen der CA-Aktivität während des ersten gonadotropen Zyklus (s. Kap. 3.3.2) liegen die GC-MS-Daten höher als die radioaktiv gemessenen Werte. Während einer 9 Stunden-Inkubation wurde nach einer Stunde der Faktor 11, nach 3 Stunden der Faktor 8

und nach 9 Stunden der Faktor 7 ermittelt. Dieses Verhältnis von JH-III (mit GC-MS) zu ^{14}C -JH-III wurde auch in Inkubationsansätzen gefunden, die mit aktiven CC-Fraktionen (Sephadex LH20) angereichert waren. Der Verlust an ^{14}C -JH-III bei der Aufarbeitung für die Messung der Radioaktivität wurde durch Zugabe von ^3H -JH-III als inneren Standard in jeder Probe bestimmt und erklärt nicht diese Differenz. Dasselbe gilt für den Wiederfindungsfaktor bei der GC-MS-Methode. Die Differenz läßt sich somit nur mit der Verdünnung des ^{14}C -JH-III durch unmarkiertes JH-III während der Inkubation erklären. Da auch das unmarkierte Methionin des Mediums berücksichtigt wurde, konkurrieren möglicherweise austauschbare native Methylgruppen der CA mit ^{14}C -Methionin bei der Veresterung. Mauchamp et al.¹⁴⁹ berichten von ähnlichen Differenzen zwischen JH-III, das mit GC-MS ermittelt wurde, und radioaktivem JH-III. Sie reinigten JH-III hauptsächlich über HPLC, ohne es zu derivatisieren. Pratt und Tobe⁷⁰ widersprechen dem Einbau von unmarkierten Methylgruppen, weil sie ab 30 Minuten nach Inkubationsbeginn eine lineare Inkorporationsrate der ^{14}C -Methylgruppe finden. Unmarkiertes JH-III wurde aber von ihnen nicht direkt gemessen.

Nach Zugabe von Allatotropin ins Inkubationsmedium wird die JH-Synthese sowohl in Medium mit als auch ohne Farnesol erhöht. Nachdem das geschwindigkeitsbestimmende Enzym (eventuell auch mehrere) nicht bekannt ist, kann auch über die Wirkungsweise des allatotropen Faktors auf molekularer Ebene nichts ausgesagt werden. Humorale und nervöse Signale wirken über intrazelluläre Substanzen, wie zyklische Nukleotide und Ionen. Morgan und Mordue¹⁵⁰ fanden einen erhöhten cAMP-Gehalt in Locusta migratoria, die in Zusammenhang mit der durch das Diuretische Hormon stimulierten Ausscheidung stehen sollen. Die JH-III-Biosynthese in D. punctata-CA wird durch intrazelluläres und exogenes cAMP dosisabhängig gehemmt⁹², während L. migratoria-CA durch cAMP (0,1 mM) im Inkubationsmedium kaum

beeinflusst werden (s. Kap. 3.1). Der allatotrope Faktor kann sowohl die JH-Biosynthese aktivieren als auch die Freisetzung des JH-III ins Medium stimulieren. CA aus 2,5 Tage alten Weibchen enthalten kein JH-III, sie synthetisieren aber in vitro durchschnittlich 30 pmol ^{14}C -JH-III und sind durch ATH aktivierbar (um den Faktor 3 - 5). Diese Ergebnisse zeigen, daß der CA-Test zur Isolierung des ATH ein wertvolles Instrument darstellt, aber seine Grenzen in der Interpretation der ATH-Wirkung hat. Dazu sind Untersuchungen der ATH-Rezeptoren und der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der JH-Biosynthese notwendig.

4.4 Charakterisierung des Allatotropins

Aus den Corpora cardiaca und Gehirnen, die durch Mikrooperationen gewonnen werden, wird ATH mit Methanol extrahiert. Durch Gelchromatographie über Sephadex, Adsorption an LiChroprep RP8 und anschließende HPLC-Reinigung wird der allatotrope Faktor um das 500fache angereichert (s. Tab. 19).

ATH-Aktivität wird durch Anti-Gehirn-Antikörper in vivo ausgeschaltet^{60,63} und wird durch Trypsin und Pronase hydrolysiert. Ferenz und Diehl¹⁰⁹ dagegen berichten, daß die allatotrope Aktivität durch Trypsin nicht zerstört wird. Zusätzlich erlaubt das chromatographische Verhalten des Allatotropins an Sephadex G10, LH20 und G15, LiChroprep RP8 und an RP18-Material in der HPLC die Aussage, daß es ein Peptid ist. Dies wird durch eine erste Aminosäurenanalyse bestätigt.

Das Molekulargewicht des allatotropen Faktors beträgt nach Aminosäurenanalyse mindestens 1370 D. Von Ferenz und Diehl¹⁰⁹ wird die Molekülgröße des ATH auf Grund seines chromatographischen Verhaltens an Sephadex G10 auf ca.

2000 D geschätzt. Das ATH, das aus Gehirn von Manduca sexta-Puppen isoliert wurde, hat ein Molekulargewicht von 40 kD und einen IP bei 5.5¹⁴³. Außer durch seine Sensitivität gegenüber Proteasen wurde von Gadot et al.¹¹⁰ der allatotrope Faktor aus Locusta-Gehirnen nicht näher charakterisiert. Über die bisher gefundenen Neuropeptide, die die CA aktivieren, sind nur wenige Eigenschaften bekannt. Es dürfte sich aber um drei verschiedene Peptidfaktoren handeln, die alle die Synthesefähigkeit der CA anregen. Die Größenordnung des in dieser Arbeit beschriebenen Faktors liegt im Bereich der Releasingfaktoren der Säuger. Nachdem über die Wirkungsweise des Peptids noch keine Aussage gemacht werden kann, ist eine Funktion des Allatotropins als JH-Releasingfaktor nicht auszuschließen.

Die in Kapitel 3.5.5.4 (Tab. 17) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die ATH-Aktivität auch noch in einer anderen Fraktion (s. Tab. 17, Fraktion A-5) gefunden wird. Die biologische Aktivität beträgt aber nur ca. 60 % des in Fraktion A-8 gefundenen Faktors, der ein Molekulargewicht von mindestens 1370 D besitzt. Bei Insekten werden physiologische Vorgänge auch von mehreren Faktoren oder Hormonen gesteuert, die sich chemisch nur durch den Austausch einzelner Aminosäuren unterscheiden. Für AKH II aus Locusta migratoria wird nicht ausgeschlossen, daß es sich um ein metabolisches Nebenprodukt der Hormonsynthese, der Freisetzung oder des Abbaus von AKH I handelt¹⁵¹. Als Beispiele sind in Tabelle 20 einige Hormone aufgeführt, die bereits sequenziert oder deren Aminosäurezusammensetzungen bekannt sind.

Tabelle 20 Aminosäuresequenzen von verwandten Neuropeptiden aus Insekten (L = L. migratoria, S = S. gregaria) und einem Neuropeptid aus Mollusken, das den roten Farbstoff der Augen konzentriert (RPCH¹⁵³).

Neuropeptid	Sequenz
AKH I	pGlu-Leu-Asn-Phe-Thr-Pro-Asn-Trp-Gly-ThrNH ₂
AKH II - L	pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Ala-Gly-TrpNH ₂
AKH II - S	pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Thr-Gly-TrpNH ₂
AKH (<u>M. sexta</u>)	pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Ser-Ser-Trp-GlyNH ₂
M I = HGH I	pGlu-Val-Asn-Phe-Ser-Pro-Asn-TrpNH ₂
M II = HGH II	pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr-Pro-Asn-TrpNH ₂
RPCH	pGlu-Leu-Asn-Phe-Ser-Pro-Gly-TrpNH ₂

Die physiologische Wirksamkeit der einzelnen Homologen unterscheidet sich zum Teil beträchtlich; meist besitzt nur eine Substanz eine starke biologische Wirkung. Obwohl das Neurohormon D, der myoaktive Faktor der Küchenschabe und das Hypertrehalosämische Hormon unterschiedliche Funktionen erfüllen, besitzen sie wahrscheinlich identische Strukturen¹⁵². Die Myoaktiven Hormone I und II aus Periplaneta americana sind wahrscheinlich mit den Herzschlagfördernden Peptiden I und II identisch. Beide besitzen auch hypertrehalosämische Wirkung^{4,152}. RPCH aus Mollusken zeigt in Wanderheuschrecken adipokinetische Wirkung (Erhöhung des Diglyceridgehaltes), umgekehrt stimuliert AKH in Krebsen die Pigmentbildung der Augen¹⁵⁴. Die Homologie in den Sequenzen lassen für die Insektenneurohormone eine Peptidfamilie vermuten (s. Tab. 20).

In Locusta migratoria steht die JH-III-Biosynthese in den CA unter dem Einfluß mindestens eines allatotropen Faktors und wahrscheinlich auch eines Allatohibins. Für die Isolierung des AKH wurden 2000 CC benötigt. Die UV-Absorp-

tion von AKH (vgl. Abb. 26) ist um fast 2 Zehnerpotenzen höher als die von ATH, das eine kürzere Retentionszeit besitzt. Obwohl ATH nur in geringer Substanzmenge in den CC vorliegt, besitzt es doch eine große physiologische Wirkung (1 CC-Äquivalent). Deshalb ist das Abschätzen der Substanzmenge, die für die Isolierung des ATH benötigt wird, schwierig. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden ca. 2000 CC durch Mikrooperation isoliert. Mit den heute verfeinerten Methoden zur Strukturaufklärung (Mikroaminosäurenanalyse, Fast Atom Bombardement mit Tandem MS) dürfte zum derzeitigen Stand eine Menge von weiteren 2000 CC für die Reindarstellung des ATH ausreichend sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der bekannte, von Pratt und Tobe beschriebene *in vitro* CA-Test wurde für die Anreicherung des allatotropen Hormons modifiziert. Testdauer und Zusätze zum Inkubationsmedium, insbesondere der Einfluß von Farnesol als JH-III-Vorstufe, wurden untersucht und die Testbedingungen (z. B. Alter der Spendertiere) standardisiert. Außerdem wurde die Reinigung des ^{14}C -JH-III aus dem Inkubationsmedium so weit optimiert, daß eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig aufgearbeitet und der Verlust von ^{14}C -JH-III durch Zugabe eines inneren Standards bestimmt werden konnte.

Während des ersten Eireifungszyklus von Locusta migratoria wurde jeweils von demselben Tier der JH-Titer der Hämolymphe und die *in vitro* JH-III-Biosyntheseaktivität der CA gemessen. Die CA-Aktivität steigt ab der Adulthäutung langsam an, während die Hämolymphe noch geringe JH-III-Mengen enthält. Mit dem beginnenden Eiwachstum steigen beide Parameter stark an und erreichen ihr Maximum (zeitlich um einen Tag versetzt) kurz vor der Eiablage. Zum Zeitpunkt der Eiablage fallen beide drastisch ab. Die CA selbst enthalten erst gegen Ende der Eireifung maximal 1 pmol JH-III. Zur Abtrennung von JH-III-Säure bei der Aufarbeitung von JH-III wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, die Säure nach Derivatisierung ebenfalls mit der GC-MS-Methode zu bestimmen.

Allatotropes Hormon (ATH) wurde aus Gehirnen und Corpora cardiaca (CC) durch Extraktion mit Methanol und anschließende Gelchromatographie über Sephadex G10, LH20 oder G15 vorgereinigt. Durch Filtration über LiChroprep RP8 und Hochdruckflüssigchromatographie, ebenfalls an RP-Material, wurde das Allatotropin weiter angereichert. Auf der Stufe der LiChroprep-Reinigung wurde für das ATH eine Dosis-Wir-

kungs-Beziehung untersucht; maximale Wirkung wurde unter den angegebenen in vitro-Versuchsbedingungen durch 1 CC-Äquivalent erreicht. ATH stimuliert die JH-III-Biosynthese in vitro um das 3 - 5fache.

Bezogen auf die Proteinmenge, die durch Extraktion der Drüsen gewonnen wurde, wurde eine Anreicherung des ATH um den Faktor 500 erzielt. Wegen seiner starken physiologischen Wirkung und der damit verbundenen geringen Substanzmenge des ATH in den CC (im Vergleich zum Adipokinetischen Hormon) wurde eine Reindarstellung und eine Strukturaufklärung nicht erreicht. Es gelang, ATH durch sein chromatographisches Verhalten, seine Inaktivierung durch Trypsin und Pronase und durch eine erste Aminosäurenanalyse zu charakterisieren.

6. LITERATUR

- (1) Stone, J.V., Mordue, W., Batley, K.E. & Morris H.R. (1976) Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. Nature 263, 207-211
- (2) Ziegler, R., Kegel, G. & Keller R. (1984) Isolation and amino-acid composition of the adipokinetic hormone of Manduca sexta. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1451-1456
- (3) Baumann, E. & Gersch M. (1982) Purification of neurohormone D, a heart accelerating peptide from the corpora cardiaca of the cockroach, Periplaneta americana. Insect Biochem. 12, 7-14
- (4) Scarborough, R.M., Jamieson, G.C., Kalish, F., Kramer, S.J., McEnroe, G.A., Miller, C.A. & Schooley, D.A. (1984) Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of Periplaneta americana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5575-5579
- (5) Nagasawa, H., Kataola, H., Isogai, A., Tamamura, S., Suzuki, A., Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y. & Suzuki, A. (1984) Amino-terminal amino acid sequence of the silkworm prothoracicotropic hormone: Homology with insulin. Science 226, 1344-1345
- (6) Bollenbacher, W.E., Katahira, E.J., O'Brien, M.T., Gilbert, L.I., Thomas, M.K., Agui, N. & Baumhover, A.H. (1984) Insect prothoracicotropic hormone: Evidence for two molecular forms. Science 224, 1243-1245
- (7) Matsumoto, S., Isogai, A. & Suzuki, A. (1984) Isolation of the melanization and reddish coloration hormone (MRCH) of the armyworm, Leucania separata, from the silkworm, Bombyx mori. Agric. Biol. Chem. 48, 2401-2403
- (8) Nagasawa, H., Kamito, T., Takahashi, S., Isogai, A., Fugo, H. & Suzuki, A. (1985) Eclosion hormone of the silkworm, Bombyx mori. Insect Biochem. 15, 573-578
- (9) Truman, J.W., Rountree, D.B., Reiss, S.E. & Schwartz, L.M. (1983) Ecdysteroids regulate the release and action of eclosion hormone in the tobacco hornworm, Manduca sexta (L.). J. Insect Physiol. 29, 895-900
- (10) Berlind, A. & Maddrell, S.H.P. (1979) Changes in hormone activity of single neurosecretory cell bodies during a physiological secretion cycle. Brain Res. 161, 459-467
- (11) Aston, R.J. & Hughes, L. (1980) Diuretic hormon - extraction and properties. In: Neurohormonal Techniques

- in Insects (ed. Miller, T.A.) S. 91-115, Springer Verlag, Berlin
- (12) Herault, J.-P., Girardie, J. & Proux, J. (1985) Separation and characteristics of antidiuretic factors. *Int. J. Inv. Reprod. and Develop.* 8, 325-335
 - (13) Morgan, P.J. & Mordue, W. (1983) Separation and characteristics of diuretic hormone from the corpus cardiacum of *Locusta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B, 75-80
 - (14) Gäde, G. (1985) Amino acid composition of cockroach hypertrehalosaemic hormones. *Z. Naturforsch.* 40c, 42-46
 - (15) Frontali, N. & Gainer, H. (1977) Peptides in insect nervous systems. In: *Current Topics in Neurobiology* 3, Chap. 10, 259-294
 - (16) Siegert, I.J., Morgan, P.J. & Mordue, W. (1986) Isolation of hyperglycaemic peptides from the corpus cardiacum of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* 16, 365-371
 - (17) Gäde, G. (1984) Adipokinetic and hyperglycaemic factors of different insect species: Separation with high performance liquid chromatography. *J. Insect Physiol.* 30, 729-736
 - (18) Tublitz, N.J. & Truman, J.W. (1985a) Insect cardioactive peptides. I. Distribution and molecular characteristics of two cardioacceleratory peptides in the tobacco hawkmoth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 114, 365-379
 - (19) Tublitz, N.J. & Truman, J.W. (1985b) Insect cardioactive peptides. II. Neurohormonal control of heart activity by two cardioacceleratory peptides in the tobacco hawkmoth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 114, 381-395
 - (20) Isobe, M. & Goto, T. (1980) Diapause hormones. In: *Neurohormonal Techniques in Insects* (ed. Miller, T.A.) S. 216-243, Springer Verlag, Berlin
 - (21) Masler, E.P., Hagedorn, H.H., Petzel, D.H. & Borkovec, A.B. (1983) Partial purification of egg development neurosecretory hormone with reverse-phase liquid chromatography techniques. *Life Sci.* 33, 1925-1931
 - (22) Borovsky, D. & Thomas, B.R. (1985) Purification and partial characterization of mosquito egg development neurosecretory hormone: Evidence for gonadotropic and steroidogenic effects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2, 265-281
 - (23) Stone, J.V., Mordue, W., Broomfield, C.E. & Hardy, P.M. (1978) Structure-activity relationships for the

- lipid-mobilising action of locust adipokinetic hormone. Synthesis and activity of a series of hormone analogues. *Eur. J. Biochem.* 89, 195-202
- (24) Starrat, A.N. & Brown, B.E. (1975) Structure of the pentapeptide proctolin, a proposed neurotransmitter in insects. *Life Sci.* 17, 1253-1256
 - (25) Brown, B.E. & Starrat, A.N. (1975) Isolation of proctolin, a myotropic peptide from Periplaneta americana. *J. Insect Physiol.* 21, 1879-1881
 - (26) Cook, B.J. & Holman, G.M. (1979a) The action of proctolin and L-glutamic acid on the visceral muscles of the hindgut of the cockroach Leucophaea maderae. *Comp. Biochem. Physiol.* 64C, 21-28
 - (27) S.-Rösa, K. & Miller, T.A. (1981) Aminergic and peptideric receptors at the heart muscle of Locusta migratoria migratorioides R.&F. *Adv. Physiol. Sci.* 22, 557-2581
 - (28) Cook, B.J. & Meola, S. (1978) The oviduct musculature of the horse fly, Tabanus sulcifrons, and its response to 5-hydroxytryptamine and proctolin. *Physiol. Entomol.* 3, 273-278
 - (29) Piek, T. & Mantel, P. (1977) Myogenic contractions in locust muscle induced by proctolin and by wasp, Philanthus triangulum, venom. *J. Insect Physiol.* 23, 321-325
 - (30) O'Shea, M. & Adams, M.E. (1981) Pentapeptide (proctolin) associated with an identified neuron. *Science, Wash.* 213, 567-569
 - (31) Quistad, G.B., Adams, M.E., Scarborough, R.M., Carney, R.L. & Schooley, A.D. (1984) Metabolism of proctolin, a pentapeptide neurotransmitter in insects. *Life Sci.* 34, 569-576
 - (32) Kriger, L. & Davey, K.G. (1984) Identified neurosecretory cells in the brain of female Rhodnius prolixus contain a myotropic peptide. *Can. J. Zool.* 62, 1720-1723
 - (33) Witten, J.L., Schaffer, M.H., O'Shea, M., Carter Cook, J., Hemling, M.E. & Rinehart, K.J., Jr. (1984) Structure of two cockroach neuropeptides assigned by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124, 350-358
 - (34) Orchard, J. (1982) Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone, and neuromodulator. *Can. J. Zool.* 60, 659-669
 - (35) Gilbert, L.J. (1964) Physiology of growth and development. In: *Physiology of Insects* (ed. Rockstein,

M.) Academic Press, New York, London

- (36) Wigglesworth, V.B. (1964) Hormonal control of growth and reproduction in insects: Review. *Adv. Insect Physiol.* 2, 247-336
- (37) Highnam, K.C. (1968) Neurosecretion in insects. *Int. Congr. Progr. in Entomol.* 184, 351-355
- (38) Rölller, H. & Dahm, K.H. (1968) Chemistry of juvenile hormones In: *Recent Progress in Hormone Research* (ed. Astwood, E.B.) 24, 651-680, Academic Press, New York and London
- (39) Goltzene, F. (1979) Étude ultrastructurale du développement normal des ovocytes et des cellules folliculaires chez l'orthoptère Locusta migratoria (L.). *Arch. Anat. Histol. Embrol. norm. et exp.* 62, 55-72
- (40) Karlson, P. (1956) Biochemical studies on insect hormones. *Vitamines and Hormones* 14, 227-266
- (41) Dahm, K.H., Trost, B.M. & Rölller, H. (1967) The juvenile hormone. V. Synthesis of the racemic juvenile hormone. *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 5292-5294
- (42) Spindler, K.D., Beckers, C., Gröschl-Stewart, U. & Emmerich, H. (1978) A radioimmunoassay for arthropod molting hormones, introduction a novel method of immunogen coupling. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 1269-1275
- (43) Granger, N.A. & Goodman, W.G. (1983) Juvenile hormone radioimmunoassays - theory and practice. *Insect Biochem.* 13, 333-340
- (44) Rembold, H. & Lackner B. (1985) Convenient method for determination of picomole amounts of juvenile hormone. *J. Chromatogr.* 323, 355-361
- (45) Rembold, H. (1985) Mikroanalytische Bestimmung von Juvenilhormonen. *CHIMIA* 39 (11), 348-354
- (46) Kopec, S. (1917) Experiments on metamorphosis of insects. *Bull. Int. Acad. Sci. (Cracovie)* B 57-60
- (47) Wigglesworth, V.B. (1940) The determination of characters at metamorphosis in Rhodnius prolixus (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 17, 201-222
- (48) Williams C.M. (1947) Physiology of insect diapause. II. Interaction between the pupal brain and prothoracic glands in the metamorphosis of the giant silkworm, Platysamia cecropia. *Biol. Bull. Woods Hole* 93, 89-98
- (49) Tobe, S.S. & Stay, B. (1985) Structure and regulation of the corpus allatum. *Adv. Insect Physiol.* 18, 305-432

- (50) McCaffery, A.R. (1976) Effects of electrocoagulation of cerebral neurosecretory cells and implantation of corpora allata on oocyte development. J. Insect Physiol. 22, 1081-1092
- (51) Goltzene, F. & Porte, A. (1978) Endocrine control by neurosecretory cells of pars intercerebralis and the corpora allata during the earlier phases of vitellogenesis in Locusta migratoria migratorioides R. and F. (Orthoptera). Gen. Comp. Endocrinol. 35, 35-45
- (52) Lazarovič, P. & Pener, M.P. (1978) The relations of the pars intercerebralis, corpora allata, and juvenile hormone to oocyte development and oviposition in the African migratory locust. Gen. Comp. Endocrinol. 35, 375-386
- (53) Couillaud, F., Girardie, J., Tobe, S.S. & Girardie, A. (1984) Activity of disconnected corpora allata in Locusta migratoria: Juvenile hormone biosynthesis in vitro and physiological effects in vivo. J. Insect Physiol. 30, 551-556
- (54) Johnson, R.A. & Hill, L. (1973) Quantitative studies on the activity of the corpora allata in adult male Locusta and Schistocerca. J. Insect Physiol. 19, 2459-2467
- (55) Tobe, S.S., Chapman, C.S. & Pratt, G.E. (1977) Decay in juvenile hormone biosynthesis by insect corpus allatum after nerve transection. Nature (London) 268, 728-730
- (56) Engelmann, F. & Lüscher, M. (1957) Die hemmende Wirkung des Gehirns auf die Corpora allata bei Leucophea maderae (Orthoptera). Verh. Dtsch. Zool. Ges. Hamburg 1956, 215-220
- (57) Rankin, S.M. & Stay, B. (1985a) Regulation of juvenile hormone biosynthesis during pregnancy in the cockroach Diploptera punctata. J. Insect Physiol. 31, 145-157
- (58) Stay, B. & Tobe, S.S. (1977) Control of juvenile hormone biosynthesis during the reproductive cycle of a viviparous cockroach. I. Activation and inhibition of corpora allata. Gen. Comp. Endocrinol. 33, 531-540
- (59) Pipa, R.L. (1982) Neural influence on corpus allatum activity and egg maturation in starved virgin Periplaneta americana. Physiol. Entomol. 7, 449-455
- (60) Ulrich, G.M., Schlagintweit, B., Eder, J. & Rembold, H. (1985) Elimination of allatotrophic activity in locusts by microsurgical methods: Evidence for hormonal control of the corpora allata, hemolymph proteins, and ovary. Gen. Comp. Endocrinol. 59, 120-129
- (61) Girardie, A. (1966) Contrôle de l'activité génitale chez Locusta migratoria. Mise en évidence d'un facteur

gonadotrope et d'un facteur allatotrope dans la pars intercérébrale. Bull. Soc. Zool. Fr. 91, 423-439

- (62) Girardie, J., Tobe, S.S. & Girardie, A. (1981) Biosynthèse de l'hormone juvénile C_{16} (JH-III) et maturation ovarienne chez le criquet migrateur. C. R. Acad. Sci. Paris 293, 443-446
- (63) Rembold, H., Eder, J. & Ulrich, G.M. (1980) Inhibition of allatotrophic activity and ovary development in Locusta migratoria by anti-brain anti-bodies. Z. Naturforsch. 35c, 1117-1119
- (64) Lanzrein, B., Gentinetta, V., Abegglen, H., Baker, F.C., Miller, C.A. & Schooley, D.A. (1985) Titters of ecdyson, 20-hydroxyecdyson, and juvenile hormone III throughout the life cycle of a hemimetabolous insect, the ovoviviparous cockroach Nauphoeta cinerea. Experientia 41, 913-917
- (65) Uhl, M. (1985) pers. Mitteilung
- (66) Bhaskaran, G. & Jones, G. (1980) Neuroendocrine regulation of corpus allatum activity in Manduca sexta: The endocrine basis for starvation-induced supernumerary moult. J. Insect Physiol. 26, 431-440
- (67) Girardie, A. (1967) Contrôle neuro-hormonal de la métamorphose et de la pigmentation chez Locusta migratoria cinerascens (Orthoptère). Bull. Biol. Fr. Belg. 101, 79-114
- (68) Tobe, S.S., Stay, B., Friedel, T., Feyereisen, R. & Paulson, P., (1981) The role of the brain in regulation of the corpora allata in female Diploptera punctata. In: Juvenile Hormone Biochemistry (eds. Pratt, G.E. & Brooks, G.T.) S. 161-174, Elsevier, Amsterdam
- (69) Rankin, S.M. & Stay, B. (1984) The changing effect of the ovary on rates of juvenile hormone synthesis in Diploptera punctata. Gen. Comp. Endocrinol. 54, 382-388
- (70) Pratt, G.E. & Tobe, S.S. (1974) Juvenile hormones radiobiosynthesised by corpora allata of adult female locusts in vitro. Life Sci. 14, 575 - 586
- (71) Tobe, S.S. & Pratt G.E. (1974a) The influence of substrate conditions on the rate of insect juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of the desert locust in vitro. Biochem. J. 144, 107-113
- (72) Rembold, H., Schlagintweit, B. & Ulrich, G.M. (1986) Activation of juvenile hormone synthesis in vitro by a corpus cardiacum factor from Locusta migratoria. J. Insect Physiol. 32, 91-94
- (73) Schlagintweit, B. & Rembold, H. (1984) Is in vitro CA-activity a probe for JH-titres in vivo? Abstracts,

XVII Int. Congr. Ent. (Abstract), S. 163 Hamburg

- (74) Morgan, E.D. & Poole, C.F. (1974) Preparation and assessment of fluorocarbonsilylethers as gas chromatography derivatives for steroids. J. Chromatogr. 89, 225-230
- (75) Mori, K., Tominaga, M., Takigawa, T. & Matsui M. (1973) A mild transesterification method. Synthesis 1973, 790-791
- (76) Eagle, H. (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130, 432-437
- (77) Landureau, J.-C. & Grellet, P. (1972) Nouvelles techniques de culture in vitro de cellules d'insectes et leurs applications. C. R. Acad. Sci. Paris 274, 1372-1375
- (78) Morgan, J.F., Morton H.J. & Parker, R.C. (1950) Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73, 1-8
- (79) Loughton, B.G. & Tobe S.S. (1969) Blood volume in the African migratory locust. Can. J. Zool. 47, 1333-1336
- (80) Sachs, L. (1972) Statistische Auswertungsmethoden, S. 57, Springer, Berlin
- (81) Bergmeyer, H.U. (1974a) Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, S. 1670-1674, Chemie, Weinheim/Bergstr.
- (82) Bergmeyer, H.U. (1974b) Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II, S. 1676-1682, Chemie, Weinheim/Bergstr.
- (83) Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254
- (84) Tsugita, A. & Mewes, H.W. (1986) in Vorbereitung
- (85) Lee, E., Schooley, A.D., Hall, M.S. & Judy, K.J. (1978) Juvenile hormone biosynthesis: Homomevalonate and mevalonate synthesis by insect corpus allatum enzymes. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 7, 290-292
- (86) Baker, F.C., Mauchamp, B., Tsai, L.W. & Schooley, D.A. (1983) Farnesol and farnesal dehydrogenase(s) in corpora allata of the tobacco hornworm moth, Manduca sexta. J. Lipid Res. 24, 1586-1594
- (87) Feyereisen, R., Koener, J. & Tobe, S.S. (1981) In vitro studies with C₂, C₆ and C₁₅ precursors of C₁₆JH biosynthesis in the corpora allata of adult female Diploptera punctata. In: Juvenile Hormon Biochemistry (eds. Pratt, G.E. & Brooks, G.T.) S. 81-92, Elsevier, Amsterdam

- (88) Reibstein, D., Law, J.H., Bowlus, S.B. & Katzenellenbogen, J.A., (1976) Enzymatic synthesis of juvenile hormone in *Manduca sexta*. In: Juvenile Hormones (ed. Gilbert, L.I.) S. 131-146, Plenum, New York
- (89) Feyereisen, R., Pratt, G.E. & Hamnett, A.F. (1981) Enzymic synthesis of juvenile hormone in locust corpora allata: Evidence for a microsomal cytochrome P-450 linked methyl farnesoate epoxidase. *Eur. J. Biochem.* 118, 231-238
- (90) Tobe, S.S., Girardie, J. & Girardie, A. (1982) Enhancement of juvenile hormone biosynthesis in locusts following electrostimulation of cerebral neurosecretory cells. *J. Insect. Physiol.* 28, 867-871
- (91) Feyereisen, R., Friedel, T. & Tobe, S.S. (1981) Farnesoic acid stimulation of C_{16} -juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of adult female Diploptera punctata. *Insect Biochem.* 11, 401-409
- (92) Meller, V.H., Aucoin, R.R., Tobe, S.S. & Feyereisen, R. (1985) Evidence for an inhibitory role of cyclic AMP in the control of juvenile hormone biosynthesis by cockroach corpora allata. *Mol. Cell. Endocrinol.* 43, 155-163
- (93) Cassier, P. (1970) Influence des conditions d'élevage (isolement et groupement) sur la fécondité des femelles de Locusta migratoria migratorioides (R&F) et sur les caractéristiques de leur descendance: Données endocrines. *Coll. Int. CNRS* 189, 87-111
- (94) Rembold, H. (1981) Modulation of JH-III-titer during the gonotrophic cycle of Locusta migratoria, measured by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry. In: Juvenile Hormone Biochemistry (eds. Pratt, G.E. & Brooks, G.T.) S. 11-20, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam
- (95) Pratt, G.E., Tobe, S.S., Weaver, R.J. & Finney, J.R. (1975) Spontaneous synthesis and release of C_{16} juvenile hormone by isolated corpora allata of female locust Schistocerca gregaria and female cockroach Periplaneta americana. *Gen. Comp. Endocrinol.* 26, 478-484
- (96) Pratt, G.E. & Pener, M.P. (1983) Precocene sensitivity of corpora allata in adult female Locusta migratoria after electrocoagulation of the pars intercerebralis neurosecretory cells. *J. Insect Physiol.* 29, 33-39
- (97) Pener, M.P. (1983) pers. Mitteilung
- (98) Granger, N.A., Bollenbacher, W.E., Vince, R., Gilbert, L.I., Baehr, J.C. & Dray, F. (1979) In vitro biosynthesis of juvenile hormone by larval corpora

- allata of Manduca sexta: Quantification by radioimmunoassay. Mol. Cell. Endocrinol. 16, 1-17
- (99) W. E. Bollenbacher, N. Agui, N. A. Granger, L. J. Gilbert (1979), In vitro activation of insect prothoracic glands by the prothoracicotropic hormone (Manduca sexta). Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)
- (100) Ferenz, H.J. & Kaufner, I. (1981) Juvenile hormone synthesis in regulation to oogenesis in Locusta migratoria. In: Juvenile Hormone Biochemistry (eds. Pratt, G.E. & Brooks, G.T.) S. 135-145, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam
- (101) Tobe, S.S. (1977) Asymetry in hormone biosynthesis by insect endocrine glands. Can. J. Zool. 55, 1509-1514
- (102) Feyereisen, R. & Tobe, S.S. (1981) A rapid partition assay routine analysis of juvenile hormone release by insect corpora allata. Anal. Biochem. 111, 372-375
- (103) Granger, N.A., Niemiec, S.M., Gilbert, L.I. & Bollenbacher, W.E. (1982) Juvenile hormone synthesis in vitro by larval and pupal corpora allata of Manduca sexta. Mol. Cell. Endocrinol. 28, 587-604
- (104) Sehnaal, F. & Rembold, H. (1985) Brain stimulation of juvenile hormone production in insect larvae. Experientia 42, 684-685
- (105) Lanzrein, B., Gentinetta, V., Fehr, R. & Lüscher, M. (1978) Correlation between haemolymph juvenile hormone titre, corpus allatum volume, and corpus allatum in vivo and in vitro activity during oocyte maturation in a cockroach (Nauphoeta cinerea). Gen. Comp. Endocrinol. 36, 339-345
- (106) Khan, M.A., Koopmanschap, A.B. & de Kort, C.A.D. (1983) The relative importance of nervous and humoral pathways for control of corpus allatum activity in the adult Colorado potato Beetle, Leptinotarsa decemlineata (Say). Gen. Comp. Endocrinol. 52, 214-221
- (107) Tobe, S.S., Ruegg, R.P. Stay, B.A., Baker, F.C., Miller, C.A. & Schooley, D.A. (1985) Juvenile hormone titer and regulation in the cockroach Diploptera punctata. Experientia 41, 1028-1034
- (108) Sparagana, S.P., Bhaskaran, G. & Barrera, P. (1985) Juvenile hormone acid methyltransferase activity in imaginal discs of Manduca sexta prepupae. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2, 191-202
- (109) Ferenz, H.J. & Diehl, J. (1983) Stimulation of juvenile hormone biosynthesis in vitro by locust allatotropin. Z. Naturforsch. 38c, 856-858
- (110) Gadot, M. & Applebaum, S.W. (1985) Rapid in vitro

- activation of corpora allata by extracted Locust brain allatotrophic factor. Arch. Insect Biochem. Physiol. 2, 117-129
- (111)Williams, D.H. & Fleming, I. (1979) In: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung. S. 26, Thieme, Stuttgart
- (112)Gellissen, G. & Emmerich, H. (1978) Changes in the titer of vitellogenesis and of diglyceride carrier lipoprotein in the blood of adult Locusta migratoria. Insect Biochem. 8, 403-412
- (113)Couillaud, F., Mauchamp, B. & Girardie, A. (1985) Regulation of juvenile hormone titer in African locust. Experientia 41, 1165-1167
- (114)Bergot, B.J., Schooley, D.A. & de Kort, C.A.D. (1981) Identification of JH III as the principal juvenile hormone in Locusta migratoria. Experientia 37, 909-910
- (115)Huibregtse-Minderhoud, L., Van den Hondel-Franken, M.A.M., Van der Kerk-Van Hoof, A.C. Biessels, H.W.A., Salemink, C.A., Van der Horst, D.J. & Beenackers, M.Th. (1980) Quantitative determination of the juvenile hormones in the haemolymph of Locusta migratoria during normal development and after implantation of corpora allata. J. Insect Physiol. 26, 627-631
- (116)Porcheron, P., Papillon, M. & Baehr, J.C. (1982) Hormonal levels and protein variations during sexual maturation of Schistocerca gregaria; effect of rearing temperature. Experientia 38, 970-972
- (117)McCaffery, A.R. & McCaffery, V.A. (1983) Corpus allatum activity during overlapping cycles of oocyte growth in adult female Melanoplus sanguinipes. J. Insect Physiol. 29, 259-266
- (118)Weaver, R.J. & Pratt, G.E. (1977) The effect of enforced virginity and subsequent mating on the activity of the corpus allatum of Periplaneta americana measured in vitro, as released to changes in the rate of oocyte maturation. Physiol. Entomol. 2, 59-76
- (119)Tobe, S.S. & Pratt, G.E. (1975) Corpus allatum activity in vitro during ovarian maturation in the desert locust, Schistocerca gregaria. J. Exp. Biol. 62, 611-627
- (120)Lanzrein, B., Wilhelm, R. & Buschor, J. (1981) On the regulation of the corpora allata activity in adult females of the ovoviviparous cockroach Nauphoeta cinerea. In: Juvenile Hormon Biochemistry (eds. Pratt, G.E. & Brooks, G.T.) S. 147-160, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam
- (121)Espig, W. & Hoffmann, K.H. (1985) Juvenile hormone and

- reproduction in the cricket. II. Effect of rearing temperature on the corpus allatum activity (in vitro) in adult females. Experientia 41, 758-759
- (122) Tobe, S.S. & Pratt, G.E. (1974b) Dependence of juvenile hormone release from corpus allatum on intraglandular content. Nature (London) 252, 474-476
- (123) Tobe, S.S. & Stay, B. (1977) Corpus allatum activity in vitro during the reproductive cycle of the viviparous cockroach, Diploptera punctata (Eschscholtz). Gen. Comp. Endocrinol. 31, 138-147
- (124) Peter, M.G., Gunawan, S., Gellissen, G. & Emmerich, H. (1979) Differences in hydrolysis and binding of homologous juvenile hormones in Locusta migratoria hemolymph. Z. Naturforsch. 34c, 585-598
- (125) Poras, M., Baehr, J.C. & Cassier, P. (1983) Control of corpus allatum activity during the imaginal diapause in females of Locusta migratoria L. Int. J. Invertebr. Reprod. 6, 111-122
- (126) Rankin, S.M. & Stay, B. (1985b) Ovarian inhibition of juvenile hormone biosynthesis in the viviparous cockroach, Diploptera punctata. Gen. Comp. Endocrinol. 59, 230-237
- (127) Girardie, A. (1983) Neurosecretion and reproduction. In: Endocrinology of Insects (eds. Downer, R.G.H. & Laufer, H.) S. 305-317, Liss, New York
- (128) Bhaskaran, G. (1981) Regulation of corpus allatum activity in last instar Manduca sexta larvae. In: Current Topics and Insect Endocrinology and Nutrition (eds. Bhaskaran, G., Friedmann, S. & Rodriguez, J.G.) S. 53-81, Plenum, New York
- (129) Nijhout, H.F. (1975) Axonal pathways in the brain-retrocerebral neuroendocrine complex of Manduca sexta (L.) Int. J. Insect Morphol. Embryol. 4, 529-538
- (130) Girardie, A. (1974) Recherches sur le rôle physiologique des cellules neurosecrétices latérales du protocerebron de Locusta migratoria migratorioides (Insecte Orthoptère). Zool. Jb. Physiol. 78, 310-326
- (131) McCaffery, A.R. & Highnam, K.C. (1975) Effects of corpus allatum hormone and its mimics on the activity of cerebral neurosecretory system of Locusta migratoria migratorioides R.&F. Gen. Comp. Endocrinol. 25, 373-386
- (132) Bogus, M.J. (1986) Pers. Mitteilung
- (133) Strong, L. (1965) The relationship between the brain, corpora allata, and oocyte growth in the Central American locust, Schistocerca sp. II. The innervation of corpora allata, the lateral neurosecretory complex,

and oocyte growth. *J. Insect Physiol.* 11, 271-280

- (134)Moulins, M., Girardie, A. & Girardie, J. (1974) Manipulation of sexual physiology by brain stimulation in insects. *Nature (London)* 250, 339-340
- (135)Rankin, S.M. & Stay, B. (1983) Effects of decapitation and ovariectomy on the regulation of juvenile hormone synthesis in the cockroach, Diploptera punctata. *J. Insect Physiol.* 29, 839-845
- (136)Stay, B., Friedel, T., Tobe, S.S. & Mundall, E.C. (1980) Feedback control of juvenile hormone synthesis in cockroaches: Possible role for ecdysterone. *Science* 207, 898-900
- (137)Khan, M.A., Koopmanschap, A.B. & de Kort, C.A.D. (1982) The effects of juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and precocene II on activity of corpora allata and the mode of negative-feedback regulation of these glands in the adult Colorado potato beetle. *J. Insect Physiol.* 28, 995-1001
- (138)Watson, R.D., Whisenton, L.R., Bollenbacher, W.E. & Granger, N.A., (1986) Interendocrine regulation of the corpora allata and the prothoracic glands of Manduca sexta. *Insect Biochem.* 16, 149-155
- (139)Tobe, S.S., Clarke, N., Stay, B. & Ruegg, R.P. (1984) Changes in cell number and activity of the corpora allata in the cockroach Diploptera punctata: A role for mating and the ovary. *Can. J. Zool.* 62, 2178-2182
- (140)Friedel, T., Feyereisen, R., Mundall, E.C. & Tobe, S.S. (1980) The allatostatic effect of 20-hydroxyecdysone on the adult viviparous cockroach, Diploptera punctata. *J. Insect Physiol.* 26, 665-670
- (141)Couillaud, F. & Girardie, A. (1985) Control of C-16 juvenile hormone biosynthesis in active corpora allata of female African locusts. *Int. J. Inv. Reprod. and Develop.* 8, 303-315
- (142)Rankin, S.M., Stay, B., Aucoin, R.R. & Tobe, S.S. (1986) In vitro inhibition of juvenile hormone synthesis by corpora allata of the viviparous cockroach, Diploptera punctata. *J. Insect Physiol.* 32, 151-156
- (143)Granger, N.A., Mitchell, L.J., Janzen, W.P. & Bollenbacher, W.E., (1984) Activation of Manduca sexta corpora allata in vitro by a cerebral neuropeptide. *Mol. Cell. Endocrinol.* 37, 349-358
- (144)Metzler, M., Dahm, K.H., Meyer, D. & Röllner, H. (1971) On the biosynthesis of juvenile hormone in the adult cecropia moth. *Z. Naturforsch.* 26, 1270-1276

- (145) Judy, K.J., Schooley, D.A., Dunham, L.L., Hall, M.S., Bergot, B.J. & Siddall, J.B. (1973a) Isolation, structure, and absolute configuration of a new natural insect juvenile hormone from Manduca sexta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1509-1513
- (146) Tobe, S.S. & Pratt, G.E. (1976) Farnesenic acid stimulation of juvenile hormone synthesis as an experimental probe in corpus allatum physiology. In: The Juvenile Hormones (ed. Gilbert, L.I.) S. 147-163, Plenum, New York
- (147) Schooley, D.A. & Baker, F.C. (1984) Juvenile hormone biosynthesis. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (eds. Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I.) Vol. 7, Pergamon, Oxford
- (148) Feyereisen, R., Ruegg, R.P. & Tobe, S.S. (1984) Juvenile hormone biosynthesis: Stoichiometric incorporation of (2-¹⁴C)acetate and effects of exogenous farnesol and farnesoic acid. Insect Biochem. 14, 657-661
- (149) Mauchamp, B., Couillaud, F. & Malosse, C. (1985) Gas chromatography-mass spektroskopy analysis of juvenile hormone released by insect corpora allata. Anal. Biochem. 145, 251-256
- (150) Morgan, P.J. & Mordue, W. (1985) Cyclic AMP and locust diuretic hormone action. Hormone induced changes in cAMP levels offers a novel method for detecting biological activity of uncharacterized peptide. Insect Biochem. 15, 247-257
- (151) Mordue, W. & Morgan, P.J. (1984) Peptides from the corpora cardiaca and CNS of Locusts. In: Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones (eds. Hoffmann, J. & Porchet, M.) S. 118-125, Springer, Berlin
- (152) Gäde, G. (1985) Hypertrehalosaemic hormones and myoactive factors from cockroach corpus cardiacum are very likely identical. Naturwissenschaften 72, 95-97
- (153) Fernlund, P. (1974) Structure of the red pigment concentrating hormone of the shrimp Pandalus borealis. Biochim. Biophys. Acta 371, 304-311
- (154) Goldsworthy, G.J. & Wheeler, C.H. (1985) Neurosecretory hormones in insects. Endeavour (New Series) 9, 139-143
- (155) Hagedorn, H.H., O'Connor, J.D., Fuchs, M.S., Schlaeger, D.A. & Bohm, M.K. (1975) The ovary as a source of a-ecdysone in an adult mosquito. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3255-3259
- (156) Engelmann, F. (1979) Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. Adv.

Insect Physiol. 14, 49-108

- (157) Chen, T.T., Couble, P., de Lucca, F.-L. & Wyatt, R.G. (1976) Juvenile hormone control of vitellogenin synthesis in Locusta migratoria. In: The Juvenile Hormones (ed. Gilbert, L.I.) S. 505-529, Plenum Press, New York and London
- (158) Rapport, M.M. & Graf, L. (1969) Immunological reactions of lipids. Progr. Allergy 13, 273-331

7. LEBENS LAUF

Am 22.9.1956 wurde ich als Tochter des Elektromeisters und Postinspektors Peter Fronia und seiner Ehefrau Maria Fronia, geb. Lang, in München geboren.

Von September 1962 - Juli 1968 besuchte ich die Grundschulen an der Werdenfelsstraße und an der Zielstattstraße in München. Von September 1968 - Juli 1972 besuchte ich die Elly-Heuss-Realschule in München, die ich mit der Mittleren Reife abschloß. Danach trat ich in das Klenze-Gymnasium über und bestand dort im Mai 1975 die Reifeprüfung.

Nachdem ich zum Wintersemester 1975/76 keine Zulassung für das Studium der Lebensmittelchemie bekam, studierte ich in diesem Semester Chemie und Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Sommersemester 1976 begann ich mit dem Studium der Lebensmittelchemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Hier legte ich im Dezember 1981 die Erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker ab.

Ab Februar 1982 fertigte ich bei Prof. Dr. Heinz Rembold am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried meine Doktorarbeit über den Nachweis und die Anreicherung des Allatotropen Hormons an. Diese Arbeiten wurden im Dezember 1985 abgeschlossen.

